

501,930

10 Rec 2004

12 9 JUL 2004

協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 8 月 7 日 (07.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/064655 A1

- | | | |
|--|---|---|
| <p>(51) 国際特許分類:
9/10, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10</p> <p>(21) 国際出願番号:
PCT/JP03/00883</p> <p>(22) 国際出願日:
2003 年 1 月 30 日 (30.01.2003)</p> <p>(25) 国際出願の言語:
日本語</p> <p>(26) 国際公開の言語:
日本語</p> <p>(30) 優先権データ:
特願2002-21159 2002 年 1 月 30 日 (30.01.2002) JP
特願2002-122673 2002 年 4 月 24 日 (24.04.2002) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高島 晶 (TAKASHIMA, Shou) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光</p> | <p>C12N 15/54,</p> <p>PCT/JP03/00883</p> <p>2003 年 1 月 30 日 (30.01.2003)</p> <p>日本語</p> <p>日本語</p> <p>2002 年 1 月 30 日 (30.01.2002) JP
2002 年 4 月 24 日 (24.04.2002) JP</p> <p>理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).</p> <p>高島 晶 (TAKASHIMA, Shou) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光</p> | <p>市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 辻本雅文 (TSUJIMOTO, Masafumi) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号 理化学研究所内 Saitama (JP). 辻 崇一 (TSUJI, Shuichi) [JP/JP]; 〒257-0033 神奈川県 秦野市 室町 2-2 6 Kanagawa (JP).</p> <p>(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).</p> <p>(81) 指定国 (国内): JP, US.</p> <p>(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).</p> <p>添付公開書類:
— 国際調査報告書</p> <p>2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。</p> |
|--|---|---|

(54) Title: SUGAR CHAIN SYNTHASES

(54) 発明の名称: 糖鎖合成酵素

(57) Abstract: It is intended to provide an O-glycan α 2,8-sialyltransferase having a novel substrate specificity and a substrate selectivity and a β -galactoside α 2,6-sialyltransferase having a novel substrate specificity and a substrate selectivity. These sialyltransferases are usable as drugs for inhibiting cancer metastasis, preventing viral infection, inhibiting inflammation and potentiating nerve tissue.

(57) 要約:

本発明によれば、新規な基質特異性および基質選択性を有する O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素、並びに、新規な作用および基質特異性を有する β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素が提供される。本発明のシアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染防止、炎症反応抑制、神経組織賦活作用を目的とする医薬として用いることが可能である。

WO 03/064655 A1

BEST AVAILABLE COPY

明細書

糖鎖合成酵素

技術分野

本発明は糖鎖合成酵素および該酵素をコードするDNAに関するものである。さらに詳しくは、本発明はムチンなどのO型糖鎖のうち、末端に Sia α 2, 3(6) Gal (Sia: シアル酸、Gal: ガラクトース) 構造をもつ糖鎖のシアル酸部分に α 2, 8 の結合様式でシアル酸を効率良く転移する酵素 (O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素、ST8Sia VI) および該酵素をコードするDNA ; 並びに、オリゴ糖などの糖鎖のうち、末端に Gal β 1, 4GlcNAc (Gal: ガラクトース、GlcNAc: *N*-アセチルグルコサミン) 構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6 の結合様式でシアル酸を効率良く転移する酵素 (ST6Gal II) および該酵素をコードするDNAに関するものである。本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素および β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染抑防止、炎症反応抑制、神経細胞賦活効果を有する薬剤として、あるいは糖鎖にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための試薬、その他、酵素阻害剤等として有用である。

背景技術

シアル酸は、たとえば細胞-細胞間伝達、細胞基質相互作用、細胞接着などの重要な生理作用を司る物質である。発生、分化の過程に特異的な、あるいは臓器特異的なシアル酸含有糖鎖の存在が知られている。シアル酸は糖タンパク質および糖脂質の糖鎖部分の末端位置に存在しており、これらの部位へのシアル酸の導入は、酵素的に CMP-Sia からの転移によってなされる。

このシアル酸の酵素的導入 (シアル酸転移) を担う酵素は、シアル酸転移酵素 (sialyltransferase) と呼ばれるグリコシルトランスフェラーゼ類である。ほ乳類では現在までに 18 種類のシアル酸転移酵素の存在が知られているが、これらはシ

アル酸の転移様式から 4 つのファミリーに大別される (Tsuji, S. (1996) *J. Biochem.* 120, 1-13)。すなわち、 $\alpha 2, 3$ の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素 (ST3Gal-ファミリー)、 $\alpha 2, 6$ の結合様式でガラクトースにシアル酸を転移する $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 (ST6Gal-ファミリー)、 $\alpha 2, 6$ の結合様式で N-アセチルガラクトサミンにシアル酸を転移する GalNAc $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素 (ST6GalNAc-ファミリー)、および $\alpha 2, 8$ の結合様式でシアル酸にシアル酸を転移する $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素 (ST8Sia-ファミリー) である。

このうち $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素については現在までに 5 種類の酵素 (ST8Sia I-V) について cDNA クローニングが行われており、その酵素学的諸性質も明らかになっている (Yamamoto, A. *et al.* (1996) *J. Neurochem.* 66, 26-34; Kojima, N. *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 360, 1-4; Yoshida, Y. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 14628-14633; Yoshida, Y. *et al.* (1995) *J. Biochem.* 118, 658-664; Kono, M. *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 29366-29371)。ST8Sia I はガングリオシドの GD3 合成酵素であり、ST8Sia V は同じくガングリオシドの GD1c, GT1a, GQ1b, GT3 などを合成する酵素である。ST8Sia II, IV は神経細胞接着分子 (NCAM) の N 型糖鎖上にポリシアル酸を合成する酵素である。ST8Sia III は糖タンパク質の N 型糖鎖および糖脂質に見いだされる Sia $\alpha 2, 3$ Gal $\beta 1, 4$ GlcNAc 構造にシアル酸を転移する酵素である。これらの酵素はいずれも糖脂質あるいは N 型糖鎖を好ましい基質としており、O 型糖鎖に対する活性は、NCAM の一つのアイソフォームに見いだされる O 型糖鎖上に ST8Sia II, IV がオリゴシアル酸/ポリシアル酸を合成する例と、脂肪細胞特異的糖タンパク質 AdipoQ の O 型糖鎖に ST8Sia III が作用する例が報告されているだけである (Suzuki, M. *et al.* (2000) *Glycobiology* 10, 1113; 及び Sato C, *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 28849-28856)。すなわち今までに報告されてきている $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素は、通常 O 型糖鎖を好ましい基質としてはおらず、これを好ましい基質とする $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素の存在は知られていなかった。

また、 β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素については現在までに 1 種類の

酵素 (ST6Gal I) についてのみ cDNA クローニングが行われており、その酵素学的諸性質も明らかになっている (Hamamoto, T. and Tsuji, S. (2001) ST6Gal-I in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* (Taniguchi, N. et al. Eds.) pp295-300)。ST6Gal I は糖タンパク質、オリゴ糖またはガングリオシドなどの末端糖鎖部分に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつものに対して活性を示すが、Gal β 1, 4GlcNAc 構造のほかにラクトース (Gal β 1, 4Glc) や場合によっては Gal β 1, 3GlcNAc 構造でも基質にすることができる基質特異性の広い酵素である。基質特異性が広いということは、例えば ST6Gal I を利用した機能性オリゴ糖などの合成の際に、原材料に不純物が混入していると、それらも基質となって副産物が生じてしまう可能性が考えられる。従ってこの問題を解決するためには、基質特異性に関してより選択性の高い酵素が要求される。しかし現在までに β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性をもち、基質特異性に関してより選択性の高い哺乳動物由来の酵素は知られていなかった。

発明の開示

上記した通り、今までに知られている α 2, 8-シアル酸転移酵素は 5 種類存在するが、これらはいずれも N 型糖鎖をもつ糖タンパク質またはガングリオシドなどの糖脂質を主な基質とし、O 型糖鎖をもつ糖タンパク質に対しては活性を全く示さないか、限定的な活性を示すだけであった。本発明の第一の目的は、O 型糖鎖に対し高い活性を示す新規な O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素を提供することである。また、本発明は、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードする cDNA をクローニングし、該 O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードする DNA 配列および該酵素のアミノ酸配列を提供することを目的とする。さらに本発明は、上記の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素の構造のうち、活性に係わる部分を大量に蛋白として発現させることを目的とする。

さらにまた上記した通り、哺乳動物で今までに知られている β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は 1 種類 (ST6Gal I) だけである。これは糖タンパク質、

オリゴ糖またはガングリオシドなどの末端糖鎖部分に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつものに対して活性を示すが、Gal β 1, 4GlcNAc 構造のほかにラクトース (Gal β 1, 4Glc) や場合によっては Gal β 1, 3GlcNAc 構造でも基質にすることができる基質特異性の広い酵素である。本発明の第二の目的は、この基質特異性が広いという問題点を解決し、オリゴ糖上の Gal β 1, 4GlcNAc 構造に対してより選択性の高い基質特異性を示す新規 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素および該酵素をコードする DNA を提供することである。

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意努力し、マウス脳及び心臓の各 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、またマウス腎臓由来 cDNA を鋳型とした PCR を行うことにより、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードする cDNA をクローニングすることに成功した。さらに、本発明者は、ヒトシアル酸転移酵素 ST6Gal I のアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンを expressed sequence tag (dbEST) のデータベースで検索し、GenBank™ accession Nos. BE613250, BE612797, BF038052 の各 EST クローンを取得した。またそれらの塩基配列情報を利用して、dbEST とヒトゲノムの High throughput genomic sequence のデータベースを検索し、関連 EST クローンとゲノム遺伝子の塩基配列情報を取得した。以上の塩基配列情報をもとにポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 用のプライマーを作製し、ヒト大腸由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、得られた増幅断片と入手 EST クローン由来の DNA 断片を連結することによって翻訳領域全長を含むクローンを取得した。そして、該クローンによりコードされるタンパク質が β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有していることを確認した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素が提供される。

基質特異性：末端に Sia α 2, 3(6)Gal (ここで、Sia はシアル酸を示し、Gal はガラクトースを示す) 構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる：

好ましくは、本発明により、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素が提供される。

- (1) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列；又は
- (2) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

本発明の別の側面によれば、上記した本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードするO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

好ましくは、本発明により、下記の何れかの塩基配列を有するO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素が提供される。

- (1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列；

- (2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

- (3) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列；

- (4) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター（好ましくは、発現ベクター）；上記

した組み換えベクターにより形質転換された形質転換体；並びに上記した形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする本発明の酵素の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 26～398 から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 26～398 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 68～398 から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 68～398 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の細胞外分泌型の蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の細胞外分泌型の蛋白質をコードする遺伝子を含む組み換えベクター（好ましくは、発現ベクター）；上記した組み換えベクターにより形質転換された形質転換体；並びに上記した形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする本発明の蛋白

質の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が提供される。

(1) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、下記の何れかの塩基配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子が提供される。

(1) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号 8 に記載の塩基配列中の塩基番号 3 番目から 1 5 7 4 番目で特定される塩基配列；又は

(4) 配列表の配列番号 8 に記載の塩基配列中の塩基番号 3 番目から 1 5 7 4 番目で特定される塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクターが提供される。

本発明の組み換えベクターは、好ましくは、発現ベクターである。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の形質転換体を培養し培養物から本発明の酵素を採取することを特徴とする、本発明の酵素の製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 33～529 から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 33～529 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

(3) 配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 31～524 から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号 31～524 から成るアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒

する活性を有するアミノ酸配列：

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の遺伝子を含む組み換えベクターが提供される。

本発明の組み換えベクターは、好ましくは、発現ベクターである。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の形質転換体を培養し培養物から本発明の蛋白質を採取することを特徴とする、本発明の蛋白質の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、マウスおよびヒトのST8Sia VI cDNAの塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフLは二重線、シアリルモチーフSは破線で示してある。シアリルモチーフVSで保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。N型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。A, マウスST8Sia VI。 B, ヒトST8Sia VI。

図2は、アミノ酸配列の比較を示す。

Aは、マウスシアル酸転移酵素ST8Sia I, ST8Sia V, ST8Sia VIのアミノ酸配列の比較を示す。各シアル酸転移酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。シアリルモチーフLは二重線で、シアリルモチーフSは破線で示してあ

る。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸にはアスタリスクを付してある。

Bは、マウス(m)およびヒト(h)の ST8Sia VI のアミノ酸配列の比較を示す。両酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。

図 3 は、結合特異性の解析を示す。

Aは、マウス ST8Sia VI の分泌型組み換えタンパク質 PA-mST8Sia VI により GM3 を [14 C]-NeuAc でシアル化し、それを $\alpha 2, 3-$, $\alpha 2, 6-$ 結合特異的なシアリダーゼ (NANase II)、 $\alpha 2, 3-$, $\alpha 2, 6-$, $\alpha 2, 8-$, $\alpha 2, 9-$ 結合特異的なシアリダーゼ (NANase III) で処理した反応産物を HPTLC で展開 (展開溶媒はクロロホルム:メタノール:0.02% $\text{CaCl}_2=55:45:10$) した結果 (上段)、およびヒト ST8Sia VI の分泌型組み換えタンパク質 PA-hST8Sia VI により 3'-sialyllactose を [14 C]-NeuAc でシアル化し、それを NANase II、NANase III で処理した反応産物を HPTLC で展開 (展開溶媒は1-プロパノール:アンモニア水:水=6:1:2.5) した結果 (下段) を示す。

Bは、GM3 を PA-mST8Sia VI によりシアル化した反応産物の TLC 免疫染色の結果を示す。レーン 1, GD3 (1 μ g); レーン 2, GM3 (1 μ g); レーン 3, 反応産物。抗 GD3 モノクローナル抗体 KM641 および Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG + IgM (H+L) で反応させた後、ECL で発色した。

図 4 は、ST8Sia III または ST8Sia VI によって [14 C]-NeuAc を取り込ませた Fetuin を *N*-glycanase で処理した結果を示す。 [14 C]-NeuAc を取り込ませた Fetuin を *N*-glycanase で処理し、SDS-PAGE で解析後、BAS2000 ラジオイメージアナライザーで可視化した。

図 5 は、COS-7 細胞においてマウス ST8Sia VI 全長 cDNA を過剰発現させたときの影響を示す。

Aは、抗 NeuAc $\alpha 2, 8$ NeuAc $\alpha 2, 3$ Gal 抗体 S2-566 を用いて TLC 免疫染色を行った結果を示す。レーン 1, GD3 標準物質 (0.5 μ g); レーン 2, GQ1b 標準物質 (0.5 μ g); レーン 3, コントロールの COS-7 細胞 (30 mg) から抽出した酸性糖脂質画分; レーン 4, マウス全長 ST8Sia VI 発現ベクター pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7

細胞 (30 mg) から抽出した酸性糖脂質画分。

B は、COS-7 細胞または pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7 細胞からミクロソーム画分を調製し、SDS-PAGE に供した後 (45 μ g/レーン)、PVDF 膜に転写して S2-566 抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果を示す。レーン 1, コントロールの COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分; レーン 2, pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分; レーン 3, コントロールの COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分を *N*-グリカナーゼ処理したもの; レーン 4, pRc/CMV-ST8Sia VI を導入した COS-7 細胞から調製したミクロソーム画分を *N*-グリカナーゼ処理したもの。ST8Sia VI cDNA の導入により生じた S2-566 抗体に認識されるバンドの主なものについては、アスタリスクを付してある。

図 6 は、マウスおよびヒトの ST8Sia VI 遺伝子の発現様式を示す。

A は、マウス各種臓器より調製した poly(A)+ RNA (約 2 μ g/レーン) を用いてマウス ST8Sia VI 遺伝子の発現様式をノーザン解析した結果を示す。

B は、Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech) を用いて PCR 法によりヒト ST8Sia VI 遺伝子の発現様式を解析した結果を示す。ヒト ST8Sia VI 特異的プライマーとして、5'-CCAGTGTCCCAGCCTTTTGT-3' (図 1B の塩基番号 608-627 に相当) (配列番号 17) および 5'-TGAGTGGGGAAGCTTTGGTC-3' (図 1B の塩基番号 1407-1426 の相補鎖に相当) (配列番号 18) を用いた (PCR 増幅断片の大きさは 819 bp)。

図 7 は、ヒト ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列、およびその疎水性分布図を示す。

A は、ヒト ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフ L は二重線、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。*N* 型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。

B は、ヒト ST6Gal II の疎水性分布図を示す。N 末端側の大きな疎水性領域は膜貫通ドメインと予測される。

図 8 は、マウス ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列、およびその疎水性分布図を示す。

A は、マウス ST6Gal II cDNA の塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。膜貫通ドメインは下線、シアリルモチーフ L は二重線、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸は四角で囲ってある。N 型糖鎖が結合すると予想されるアスパラギンには上線を付してある。

B は、マウス ST6Gal II の疎水性分布図を示す。N 末端側の大きな疎水性領域は膜貫通ドメインと予測される。

図 9 は、アミノ酸配列の比較を示す。

A は、ヒトシアル酸転移酵素 ST6Gal I と ST6Gal II のアミノ酸配列の比較を示す。両シアル酸転移酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。シアリルモチーフ L は二重線で、シアリルモチーフ S は破線で示してある。シアリルモチーフ VS で保存されているヒスチジンとグルタミン酸にはアスタリスクを付してある。

B は、ヒト(h)およびマウス(m)の ST6Gal II のアミノ酸配列の比較を示す。両酵素間で保存されているアミノ酸は四角で囲ってある。

図 10 は、オリゴ糖に対する活性を示す。様々なオリゴ糖を基質 (10 μ g/レーン) として酵素反応を行い、その反応産物を HPTLC で解析 (展開溶媒は 1-プロパノール : アンモニア水 : 水 = 6 : 1 : 2.5) した結果を示す。

図 11 は、結合特異性の解析を示す。

A は、ヒト ST6Gal I (上段)、ヒト ST6Gal II (中段)、およびマウス ST6Gal II (下段) を用いて Gal β 1,4GlcNAc を [14 C]-NeuAc でシアル化し (レーン 1)、それを α 2,3-結合特異的シアリダーゼ (NANase I, レーン 2)、 α 2,3-, α 2,6-結合特異的シアリダーゼ (NANase II, レーン 3) で処理した反応産物を HPTLC で展開 (展開溶媒は 1-プロパノール : アンモニア水 : 水 = 6 : 1 : 2.5) した結果を示す。

B は、ヒト ST6Gal I (上段)、ヒト ST6Gal II (中段)、およびマウス ST6Gal

II（下段）を用いて Gal β 1, 4GlcNAc を [14 C]-NeuAc でシアル化し（レーン 1）、それを β -ガラクトシダーゼで処理した反応産物（レーン 2）、およびコントロールとして Gal β 1, 4GlcNAc を β -ガラクトシダーゼで処理した後に酵素反応を行った試料（レーン 3）を HPTLC で展開（展開溶媒は 1-プロパノール：アンモニア水：水=6:1:2.5）した結果を示す。レーン 2 のバンドがブロードなのは、 β -ガラクトシダーゼ溶液中に含まれている高濃度の硫酸アンモニウムの影響による。

図 1 2 は、ヒト ST6Gal I, ST6Gal II およびマウス ST6Gal II 遺伝子の発現パターンの解析を示す。ヒト ST6Gal I, ST6Gal II 特異的プライマーとヒト組織(A)またはヒト腫瘍細胞(B)の Multiple tissue cDNA panel (Clontech)を用い、両遺伝子の発現パターンを PCR 法で解析した。PCR は 94 度 1 分、50 度 1 分、72 度 1 分 30 秒を 1 サイクルとし、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子については 25 サイクル、ヒト ST6Gal I, ST6Gal II 遺伝子については 40 サイクル行って、反応産物をアガロースゲル電気泳動で解析した。Sk. muscle, skeletal muscle; P. bl. leukocyte, peripheral blood leukocyte。C は、マウス ST6Gal II の発現パターンを、マウス ST6Gal II 特異的プライマーとマウス組織の Multiple tissue cDNA panel (Clontech)を用い、PCR 法で解析した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

(1) 本発明の酵素及び蛋白質

本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする。

基質特異性：末端に Sia α 2, 3(6)Gal（ここで、Sia はシアル酸を示し、Gal はガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質および N 型糖鎖よりも優先的に O 型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

上記した基質特異性及び基質選択性は、本明細書に記載した実施例で取得されたマウスおよびヒト由来のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素について実証された性質である。本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の由来はマウスおよびヒト由来のものに限定されるものではなく、同型のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が他の哺乳類の組織に存在し、かつ、それらのO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が互いに高度の相同性を有していることは当業者に容易に理解される。

このようなO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素は、上記した基質特異性及び基質選択性を有することを特徴とするものであり、すべて本発明の範囲に属するものである。

このような酵素としては、哺乳類組織由来の天然型酵素やその変異体、または以下の実施例で作製したようなO-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒し、遺伝子組み換え技術により製造された細胞外分泌型蛋白質などを挙げるができるが、これらはいずれも本発明の範囲に包含されるものである。

本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の一例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素が挙げられる。

- (1) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列；又は
- (2) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

さらに、本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメイン、あるいはそのアミノ酸配列の一部を改変又は修飾して得られるO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は全て本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。このような活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列の26～398または配列番号3に記載したアミノ酸配列の68～398により特定されるO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げるができる。また、配列表の配列番号1または配列番号3に記

載したアミノ酸配列の26～100前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号1または配列番号3に記載したアミノ酸配列の101～398の領域をO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

即ち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

一方、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする。

(1) 作用；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に α 2, 6の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース β 1, 4 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース β 1, 3 N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

上記した作用及び基質特異性は、本明細書に記載した実施例で取得されたヒトおよびマウス由来の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素について実証された性質である。本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の由来はヒトまたはマウス由来のものに限定されるものではなく、同型の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が他の哺乳類の組織に存在し、かつ、それらの β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が互いに高度の相同性を有していることは当業者に容易に理解される。

このような β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素は、上記した作用および基質特異性を有することを特徴とするものであり、すべて本発明の範囲に属するものである。

このような酵素としては、哺乳類組織由来の天然型酵素やその変異体、または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒し、遺伝子組み換え技術により製造された細胞外分泌型蛋白質などを挙げることができるが、これらはいずれも本発明の範囲に包含されるものである。

本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の一例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号5または7に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

さらに、本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメイン、あるいはそのアミノ酸配列の一部を改変又は修飾して得られる β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は全て本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。このような活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号5に記載したアミノ酸配列の33～529により特定される β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げることができ

る。また、配列表の配列番号5に記載したアミノ酸配列の31～200前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列の201～529の領域を β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

同様に、活性ドメインの好ましい例としては、配列表の配列番号7に記載したアミノ酸配列の31～524により特定される β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインを挙げることができる。また、配列表の配列番号7に記載したアミノ酸配列の31～200前後までの配列はステムと呼ばれる領域なので活性には必ずしも必須ではないと考えられる。従って、配列表の配列番号7に記載したアミノ酸配列の201～524の領域を β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインとして使用してもよい。

即ち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質が提供される。

(1) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号31～524から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号31～524から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加

を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本発明の酵素又は蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術により作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1から8に記載したアミノ酸配列および塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて適当なcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の酵素をコードするDNAを取得することができる。

例えば、配列番号1および配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素をコードするcDNA、並びに配列番号5および配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAを単離する方法は以下の実施例に詳細に説明されている。もっとも、本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素をコードするcDNAの単離方法はこれらの方法に限定されることはなく、当業者は下記の実施例に記載された方法を参照しつつ、この方法を適宜修飾ないし変更することにより、容易に目的のcDNAを単離することができる。

また、本発明の酵素をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の酵素をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の酵素を産生することができる。発

現系での発現については本明細書中後記する。

さらに、本発明のO-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質も本発明に含まれる。

本発明のO-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素および β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素は、発現後に細胞内に留まり、細胞外に分泌されない場合がある。また、細胞内濃度が一定以上になると、酵素の発現量が低下するという可能性がある。上記のO-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素のO-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移活性および β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移活性を有効に利用するために、本酵素の活性を維持し、かつ発現時に細胞から分泌される可溶性形態の蛋白を製造することができる。このような蛋白としては、本発明のO-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性に関与するO-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移を触媒する蛋白質を挙げることができる。例えば、マウス免疫グロブリンIgMのシグナルペプチドや、プロテインAとの融合蛋白は本発明の分泌型蛋白の好ましい態様である。

これまでにクローニングされたシアル酸転移酵素は、他のグリコシルトランスフェラーゼと同様のドメイン構造を有している。すなわち、NH₂末端の短い細胞質中尾部、疎水性のシグナルアンカードメイン、蛋白分解感受性を有するステム(stem)領域、及びCOOH-末端の大きな活性ドメインを有する(Paulson, J. C. and Colley, K. J., *J. Biol. Chem.*, 264, 17615-17618, 1989)。本発明のO-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の

経膜ドメインの位置を調べるためには、カイト及びドゥーリトル (Kyte, J. and Doolittle, R.F., *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132, 1982) の方法に従って作成した疎水性分布図を利用することができる。また、活性ドメイン部分の推定には、各種のフラグメントを導入した組換えプラスミドを作成して利用することができる。このような方法の一例は、例えば PCT/JP94/02182 号の明細書に詳細に記載されているが、経膜ドメインの位置の確認や活性ドメイン部分の推定方法は、この方法に限定されることはない。

O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白の製造のためには、例えばシグナルペプチドとして免疫グロブリンシグナルペプチド配列を用い、O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインに対応する配列を該シグナルペプチドにインフレーム融合させればよい。このような方法としては、例えば、ジョブリンの方法 (Jobling, S.A. and Gehrke, L., *Nature* (Lond.), 325, 622-625, 1987) を利用することができる。また、本明細書の実施例に詳細に説明されているように、マウス免疫グロブリン IgM のシグナルペプチドやプロテイン A との融合蛋白を製造してもよい。もっとも、シグナルペプチドの種類やシグナルペプチドと活性ドメインの結合方法、または可溶化の方法は上記方法に限定されることはなく、当業者は、O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分を適宜選択することができるし、それらを利用可能な任意のシグナルペプチドと適宜の方法により結合することにより細胞外分泌型の蛋白を製造することができる。

(2) 本発明の遺伝子

本発明によれば、本発明の O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子、並びに β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素のア

ミノ酸配列をコードする遺伝子が提供される。

本発明のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列；

(4) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

本発明の β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(1) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番目で特定される塩基配列；又は

(4) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番

目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

本明細書で言う「1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「1から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1から60個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

さらに、本発明のO-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインから成る蛋白質、並びに該活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移または β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子も本発明の範囲に属する。

本発明の遺伝子の取得方法は上述した通りである。

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明の遺伝子は適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター

(例えばプラスミド等) でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明の遺伝子は、転写に必要な要素(例えば、プロモーター等)が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(*Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子(*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子(*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(*Bacillus Subtilis alkaline protease gene*)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)のプロモータ、またはファージ・ラムダの P_R 若しくは P_L プロモータ、大腸菌の *lac*、*trp* 若しくは *tac* プロモータなどが挙げられる。

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1(メタロチオネイン遺伝子)プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたは

t p i Aプロモータなどがある。

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはT P I 1ターミネータ若しくはA D H 3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばS V 4 0またはアデノウイルス 5 E 1 b 領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばS V 4 0エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルス V A R N A をコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはS V 4 0複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(D H F R)またはシゾサッカロマイセス・ポンベT P I 遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび/または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

(4) 本発明の形質転換体及びそれを用いた蛋白質の製造

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual* ; 及び *カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology*, 6, 47(1988)等に記載）。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス

(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である S f 9、S f 2 1 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である H i F i v e (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の酵素を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の酵素が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 1 : O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素

本発明の具体例に用いた試薬、試料類は以下の通りである。Fetuin, asialofetuin, bovine submaxillary mucin (BSM), α 1-acid glycoprotein, ovomucoid, lactosyl ceramide (LacCer), GM3, GM1a, GD1a, GD1b, GT1b, CMP-NeuAc, 6'-sialyllactose, 3'-sialyl-N-acetyllactosamine, Triton CF-54 は Sigma 社から購入した。3'-sialyllactose, 6'-sialyl-N-acetyllactosamine は Calbiochem 社から購入した。N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc), GM4, Gal, N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) は和光純薬から購入した。GD3 は雪印乳業から購入した。GQ1b は Alexis Biochemicals 社から購入した。CMP-[14 C]-NeuAc (12.0 GBq/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。シアリダーゼ (NANase II, III) は Glyko Inc 社から購入した。N-glycanase (Glycopeptidase F) は宝酒造から購入した。[α - 32 P]dCTP は NEN 社から購入した。ヒト Multiple tissue cDNA panel は Clontech 社から購入した。GM1b, およびその positional analog である GSC-68, 2, 3-sialylparagloboside (2, 3-SPG), 2, 6-sialylparagloboside (2, 6-SPG) は木曾真教授 (岐阜大学農学部) から、NeuAc α 2, 3Gal, NeuAc α 2, 6Gal は石田秀樹博士 (野口研究所) から寄贈されたものを使用した。抗 GD3 モノクローナル抗体 KM641 は協和発酵、設楽研也、花井陳雄両博士から寄贈されたものを使用した。また抗 NeuAc α 2, 8NeuAc α 2, 3Gal 抗体 S2-566 は生化学工業より購入した。Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG+IgM(H+L) は Jackson Immno Research 社から購入した。BSM, α 1-acid glycoprotein, ovomucoid の脱シアル化 (アシアロ) 糖タンパク質は、これらを 0.02N HCl 中 80 度、1 時間で処理することにより調製した。

マウスシアル酸転移酵素 ST8Sia V のアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンを National Center for Biotechnology Information の expressed sequence tag (dbEST) のデータベースで検索したところ、GenBank™ accession Nos. BE633149, BE686184, BF730564 の各クローンが得られた。これらの塩基配列情報をもとに 2 種類の合成 DNA,

5'-CTTTTCTGGAGAACTAAAGG-3' (図 1 A の塩基番号 1001-1020 に相当) (配列番号 9), 5'-AATTGCAGTTTGAGGATTCC-3' (図 1 A の塩基番号 1232-1251 の相補鎖に相当) (配列番号 10) を作製し、Israel の方法に従い (Israel, D. I. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21, 2627-2631)、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を利用してマウス脳および心臓の各 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、新規シアル酸転移酵素の一部をコードしているクローンがそれぞれの cDNA ライブラリーから 1 個ずつ得られた。全長クローンを得るため、さらに 2 種類の合成 DNA, 5'-TGGCTCAGGATGAGATCGGG-3' (図 1 A の塩基番号 68-87 に相当) (配列番号 11), 5'-TACTAGCGCTCCCTGTGATTGG-3' (図 1 A の塩基番号 725-746 の相補鎖に相当) (配列番号 12) を作製し、マウス腎臓由来 cDNA を鋳型として PCR 法により両合成 DNA 間部分の DNA を増幅した。この増幅断片とマウス脳 cDNA ライブラリーから得られたクローンを連結することにより、全長クローンを得た。この cDNA は 398 アミノ酸からなる予測分子量 45,399 の II 型膜タンパク質をコードする単一の翻訳領域を有していた。またそのアミノ酸配列にはシアル酸転移酵素に保存されているシアリルモチーフが存在していた。本タンパク質は既知マウスシアル酸転移酵素の中では ST8Sia I, V とそれぞれアミノ酸配列レベルで 42.0%, 38.3% の相同性を示した (図 2 A)。なお以下に示すようにこのタンパク質は α 2,8-シアル酸転移酵素活性を有していたことから、これを本発明の O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素 ST8Sia VI と命名した。

一方、他の哺乳動物においてもこれと同様の酵素が存在するのかを調べるため、マウス ST8Sia VI の配列情報を利用して、上記と同様にデータベースを検索したところ、ヒトやラットにも同様の酵素が存在することが確認できた。図 1 B にヒトの ST8Sia VI の配列情報を示す。マウスとヒトの ST8Sia VI ではアミノ酸配列レベルで 82.4% の相同性を示した (図 2 B)。

つぎに ST8Sia VI の酵素学的諸性質を調べるため、分泌型タンパク質の製造を行った。まずマウス ST8Sia VI について、それぞれ *Xho*I サイトを含む 2 種類の合成 DNA, 5'-TGCTCTCGAGCCCAGCCGACGCGCCTGCCC-3' (図 1 A の塩基番号 141-170 に

相当) (配列番号 1 3), 5'-TATTCTCGAGCTAAGAAACGTTAAGCCGTT-3' (図 1 A の塩基番号 1263-1293 の相補鎖に相当) (配列番号 1 4) を用い、クローニングした全長 cDNA を鋳型として PCR 法により、マウス ST8Sia VI の活性ドメインをコードする DNA 断片を増幅した。これを *Xho*I で切断後、哺乳動物発現ベクター pcDSA の *Xho*I サイトに挿入した。この発現ベクターを pcDSA-mST8Sia VI と命名した。

またヒト ST8Sia VI については、まず Human Tumor Multiple Tissue cDNA Panels (Clontech) の Colon adenocarcinoma CX-1 由来 cDNA を鋳型として、2 種類の合成 DNA, 5'-CAATTGACATATCTGAATGAGAAGTCGCTC-3' (図 1 B の塩基番号 293-315 に相当) (配列番号 1 5), 5'-TACTAACATCTCCTGTGGTTGG-3' (図 1 B の塩基番号 740-761 の相補鎖に相当) (配列番号 1 6) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片、および 2 種類の合成 DNA, 5'-CCAGTGTCCCAGCCTTTTGT-3' (図 1 B の塩基番号 608-627 に相当) (配列番号 1 7), 5'-TGAGTGGGGAAGCTTTGGTC-3' (図 1 B の塩基番号 1407-1426 の相補鎖に相当) (配列番号 1 8) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片を、両増幅 DNA 断片が共通に有する *Eco*RI サイトを利用して連結し、ヒト ST8Sia VI の活性ドメインをコードする DNA 断片を得た。これをクローニングベクター pBluescript II SK(+) の *Eco*RV サイトに挿入した後、*Mun*I と *Xho*I で切り出し、この切り出し断片を pcDSA の *Eco*RI-*Xho*I サイトに挿入したものを、発現ベクター pcDSA-hST8Sia VI と命名した。

pcDSA-mST8Sia VI および pcDSA-hST8Sia VI は、それぞれマウス免疫グロブリン IgM のシグナルペプチドと *Staphylococcus aureus* protein A, およびマウスまたはヒト ST8Sia VI の活性ドメイン(マウス ST8Sia VI ではアミノ酸番号 26-398、ヒト ST8Sia VI ではアミノ酸番号 68-398)からなる分泌型融合タンパク質をコードする。

各発現ベクターとリポフェクトアミン(Invitrogen)を用いて COS-7 細胞でその一過性発現を行った(Kojima, N. *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 360, 1-4)。ここでそれぞれの発現ベクターを導入した細胞から細胞外に分泌された本発明のタンパク質を PA-mST8Sia VI (マウス)および PA-hST8Sia VI (ヒト)と命名した。

PA-mST8Sia VI、PA-hST8Sia VI は IgG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech 社) に吸着させて培地より回収した。シアル酸転移酵素活性は Lee らの方法に準じて以下のように行った (Lee, Y.-C. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 11958-11967)。50 mM MES バッファー (pH 6.0), 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.5% Triton CF-54, 100 μ M CMP- $[^{14}C]$ -NeuAc, 糖鎖 (糖脂質の場合は 0.5 mg/ml, 糖タンパク質、オリゴ糖は 1 mg/ml になるように添加)、および PA-mST8Sia VI または PA-hST8Sia VI 懸濁液を含む反応液 (10 μ l) を 37 度で 3-20 時間インキュベートし、その後、糖脂質については C-18 カラム (Sep-Pak Vac 100 mg; Waters 社) を用いて精製したものを試料として、オリゴ糖、糖タンパク質については反応産物をそのまま試料として解析を行った。オリゴ糖、糖脂質はシリカゲル 60HPTLC プレート (Merck 社) にスポットし、エタノール:ピリジン:n-ブタノール:水:酢酸=100:10:10:30:3 の展開溶媒 (オリゴ糖用)、または 1-プロパノール:アンモニア水:水=6:1:2.5 の展開溶媒 (オリゴ糖用)、またはクロロホルム:メタノール:0.02% $CaCl_2$ =55:45:10 の展開溶媒 (糖脂質用) で展開した。糖タンパク質の場合は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析を行った。これらの放射活性を BAS2000 ラジオイメージアナライザー (フジフィルム) で可視化し、定量した。

表 1 に PA-mST8Sia VI、PA-hST8Sia VI の基質特異性を示す。

表1 ST8Sia VI の受容体基質特異性

PA-mST8Sia VI および PA-hST8Sia VI を用いて様々な受容体基質に対する特異性を検討した。各基質の濃度は、糖脂質の場合は 0.5 mg/ml に、糖タンパク質、単糖、オリゴ糖の場合は 1 mg/ml になるようにした。相対活性は Fetuin の取り込み値 PA-mST8Sia VI は 2.06 pmol/h/(ml 酵素液)、PA-hST8Sia VI は 0.204 pmol/h/(ml 酵素液)を 100 として計算した。R は N 型糖鎖の残りの糖鎖部分を意味する。ND: 測定せず。

Acceptor	Representative structures of carbohydrates	Relative rate (%)	
		Mouse ST8Sia VI	Human ST8Sia VI
Glycoproteins			
Fetuin	NeuAca2,3Galβ1,3GalNAc-O-Ser/Thr	100	100
	NeuAca2,3Galβ1,3(NeuAca2,6)GalNAc-O-Ser/Thr		
	NeuAca2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R		
Asialofetuin		0	0
α1-Acid glycoprotein	NeuAca2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R	0	0
Asialo- α1-Acid glycoprotein		0	0
BSM	NeuAca2,6GalNAc-O-Ser/Thr	375	24.2
	GlcNAcβ1,3(NeuAca2,6)GalNAc-O-Ser/Thr		
Asialo-BSM		0	0
Ovomucoid	NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAc-R	6.2	12.3
Asialoovomucoid		0	0
Glycolipids			
Lactosylceramide	Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND
	NeuAca2,3Galβ1-Cer	1.0	ND
	NeuAca2,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	13.0	1.6
	Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer		
	NeuAca2,3Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND
	NeuAca2,8NeuAca2,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	6.0	1.8
	Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,8NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	0
	NeuAca2,8Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,8NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	ND
	NeuAca2,8NeuAca2,8Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAca2,8NeuAca2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer	1.1	2.2
	NeuAca2,3Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	0
	NeuAca2,6Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer	1.0	ND
	NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	2.6	ND
	NeuAca2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	3.5	ND
	NeuAca2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	0.98	ND

Monosaccharides and oligosaccharides		
3'-Sialyllactose	NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc	629
6'-Sialyllactose	NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc	91.5
3'-Sialyl-N-acetylglucosamine	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc	411
6'-Sialyl-N-acetylglucosamine	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc	88.7
3'-Sialylgalactose	NeuAc α 2,3Gal	13.9
6'-Sialylgalactose	NeuAc α 2,6Gal	2.0
N-Acetylneuraminic acid	NeuAc	0
Galactose	Gal	0
N-Acetylglucosamine	GalNAc	0
		69.9
		10.7
		ND
		ND
		ND
		ND
		ND
		ND
		ND
		ND

PA-mST8Sia VI は GM4, GM3, GD1a, GT1b, GM1b, GSC-68, 2,3-SPG, 2,6-SPG など、非還元末端に NeuAc α 2,3(6)Gal- という構造をもつ糖脂質に対して活性を示した。このうち GM3 を基質とした場合、その反応産物は α 2,3-, α 2,6-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ (NANase II) では導入シアル酸が切断されなかったが、 α 2,3-, α 2,6-, α 2,8-, α 2,9-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ (NANase III) では、導入シアル酸が切断された (図 3 A)。またこの反応産物は抗 GD3 モノクローナル抗体 KM641 を用いた TLC 免疫染色 (Saito, M. *et al.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 230-235) によって α 2,8 結合を介してシアル酸が導入された GD3 であることが確認されたことから (図 3 B)、PA-mST8Sia VI はシアル酸を α 2,8-の結合様式で転移することが明らかになった。

一方、糖タンパク質を基質とした場合 (表 1)、PA-mST8Sia VI は O 型糖鎖のみを含有する BSM に対して最も高い活性を示した。O 型糖鎖、N 型糖鎖を含有する Fetuin、N 型糖鎖のみを含有する Ovomucoid に対しても活性を示したが、Ovomucoid に対する活性は O 型糖鎖を含むタンパク質に比べると低かった。なお、PA-mST8Sia VI はアシアロ糖タンパク質に対しては全く活性を示さなかった。また単糖およびオリゴ糖を基質とした実験により (表 1)、PA-mST8Sia VI が基質として認識する最小糖鎖単位は NeuAc α 2,3(6)Gal であることが明らかになった。

Fetuin を基質としたとき、PA-mST8Sia VI によってあらたに導入されたシアル酸の大部分は O 型糖鎖に取り込まれていることが N-glycanase 処理によって明らかになった (図 4)。すなわち PA-mST8Sia VI を用いて Fetuin を [14 C]-NeuAc でシアル化し、これを N 型糖鎖をペプチド部分から遊離する N-glycanase で処理すると、大部分 (82.7%) の放射能活性はこの Fetuin に保持されたままであった。このことは PA-mST8Sia VI によって導入されたシアル酸の大部分は O 型糖鎖に取り込まれたことを示す。一方、N 型糖鎖を受容体基質とするマウス ST8Sia III を用いて同様の実験を行ったところ、放射活性は完全に消失した。

さらに PA-mST8Sia VI の基質特異性および選択性を明らかにするため、BSM と

GM3 に対する K_m 値、 V_{max} 値を求めた。BSM に対しては K_m 値=0.03 mM, V_{max} 値=23.8 pmol/h/(ml 酵素液)で、 V_{max}/K_m 値は 793 であった。一方、GM3 に対しては K_m 値=0.5 mM, V_{max} 値=0.67pmol/h/(ml 酵素液)で、 V_{max}/K_m 値は 1.34 であった。以上の結果は、PA-mST8Sia VI にとって O 型糖鎖が糖脂質や N 型糖鎖よりはるかに好ましい基質であることを示している。

上記の酵素学的諸性質については、活性値に多少の差はあるものの PA-hST8Sia VI についても当てはまることから(表 1、図 3 A、図 4)、各種動物由来の ST8Sia VI が従来の $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素とは異なる基質特異性を有することが示されたといえる。

またマウス ST8Sia VI については、その全長クローンの細胞内における酵素活性についても調べた(図 5)。マウス ST8Sia VI の全長をコードする領域を含む 1.4 kb の *NotI*-*ApaI* 断片を、発現ベクター pRc/CMV の *NotI*-*ApaI* サイトに挿入したものを pRc/CMV-ST8Sia VI と命名し、これをリポフェクトアミンを用いて COS-7 細胞に導入した。この細胞よりガングリオシドを抽出し、NeuAc $\alpha 2, 8$ NeuAc $\alpha 2, 3$ Gal 構造を認識するモノクローナル抗体 S2-566 を用いて TLC 免疫染色を行ったところ(図 5 A)、pRc/CMV-ST8Sia VI 導入細胞において有意に NeuAc $\alpha 2, 8$ NeuAc $\alpha 2, 3$ Gal 構造を有するガングリオシド量が増加していたことが明らかになった。また細胞内の糖タンパク質についても、pRc/CMV-ST8Sia VI 導入細胞では O 型糖鎖上に新たに NeuAc $\alpha 2, 8$ NeuAc $\alpha 2, 3$ Gal 構造が形成されていた(図 5 B)。以上の結果は、マウス ST8Sia VI が生体内において $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素として機能していることを示している。

なお、マウス ST8Sia VI は腎臓、心臓、脾臓などで主に発現しているが(図 6 A)、ヒト ST8Sia VI は胎盤や胎児の各種臓器、および各種腫瘍細胞などにおいて主に発現している(図 6 B)。

実施例 2 : β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素

本発明の具体例に用いた試薬、試料類は以下の通りである。Fetuin,

asialofetuin, bovine submaxillary mucin (BSM), α 1-acid glycoprotein, ovomucoid, lactosyl ceramide (LacCer), GA1, GM3, GM1a, Gal β 1,3GalNAc, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,4GlcNAc, Triton CF-54, β -ガラクトシダーゼ (牛精巢由来) は Sigma 社から購入した。Paragloboside, ラクトースは和光純薬から購入した。CMP-[14 C]-NeuAc (12.0 GBq/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。Lacto-*N*-tetraose, Lacto-*N*-neotetraose, シアリダーゼ (NANase I, II) は Glyko Inc 社から購入した。[α - 32 P]dCTP は NEN 社から購入した。ヒトおよびマウス Multiple tissue cDNA panel は Clontech 社から購入した。BSM, α 1-acid glycoprotein, ovomucoid の脱シアル化 (アシアロ) 糖タンパク質は、これらを 0.02N HCl 中 80 度、1 時間で処理することにより調製した。

ヒトシアル酸転移酵素 ST6Gal I のアミノ酸配列を用いて、これと相同性を示す新規シアル酸転移酵素をコードしているクローンを National Center for Biotechnology Information の expressed sequence tag (dbEST) のデータベースで検索したところ、GenBankTM accession Nos. BE613250, BE612797, BF038052 の各 EST クローンが得られた。これらについては I. M. A. G. E. Consortium より該当クローンを入手した。またそれらの塩基配列情報を利用して、さらに dbEST とヒトゲノムの High throughput genomic sequence のデータベースを検索したところ、関連 EST クローンとゲノム遺伝子の塩基配列情報が得られた (Accession Nos. H94068, AA514734, BF839115, AA210926, AA385852, H94143, BF351512 (以上 EST クローン), AC016994 (ゲノム配列))。以上の塩基配列情報をもとにポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 用のプライマーを作製し、ヒト大腸由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、ここで得られた増幅断片と入手 EST クローン由来の DNA 断片を連結することによって翻訳領域全長を含むクローンを得た (図 7 A)。この cDNA は 529 アミノ酸からなる予測分子量 60,157 の II 型膜タンパク質をコードする単一の翻訳領域を有していた。なお膜貫通ドメインは疎水性分布図によりアミノ酸番号 12-30 の領域に存在することが予測された (図 7 B)。本タンパク質のアミノ酸配列にはシアル酸転移酵素に保存されているシアリルモチーフが存在してい

た。また本タンパク質は既知ヒトシアル酸転移酵素の中では ST6Gal I とアミノ酸レベルで最も高い相同性 (48.9%) を示したが (図 9 A)、他のファミリーのシアル酸転移酵素とは 21-36% 程度の相同性を示したに過ぎなかった。なお以下に示すようにこのタンパク質は β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性を有していたことから、これを本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素 ST6Gal II と命名した。またヒト ST6Gal II には、splicing variant と考えられるシアリルモチーフ S の途中から配列が異なる short form のクローンも存在していた (図 7 A)。

一方、他の哺乳動物においてもこれと同様の酵素が存在するのかを調べるため、ヒト ST6Gal II の配列情報を利用して、上記と同様にデータベースを検索したところ、マウスにも同様の酵素が存在することが確認できた。そこでマウスのクローンについてもクローニングを行うことにした。マウス 14 日目胎児由来 cDNA を鋳型として、2 種類の合成 DNA, 5'-GACAATGGGGATGAGTTTTTTACATCCCAG-3' (図 8 A の塩基番号 321-350 に相当) (配列番号 19); 5'-CGATTTCCTCCCCAAGGAGGAGTTCAGG-3' (図 8 A の塩基番号 864-893 の相補鎖に相当) (配列番号 20) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片、および 2 種類の合成 DNA, 5'-ACGTTGGACGGCAGAGAGGCCCTTCTCG-3' (図 8 A の塩基番号 774-803 に相当) (配列番号 21), 5'-ACCTTATTGCACATCAGTTCCCAAGAGTTC-3' (図 8 A の塩基番号 1582-1611 の相補鎖に相当) (配列番号 22) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片を、両増幅 DNA 断片が共通に有する *Kpn*I サイトを利用して連結し、さらにこれに 2 種類の合成 DNA, 5'-CAATGAAACCACACTTGAAGCAATGGCGAC-3' (図 8 A の塩基番号 1-30 に相当) (配列番号 23), 5'-CGCAACAAAAAATAGCTATCTTCCTCGGG-3' (図 8 A の塩基番号 381-410 の相補鎖に相当) (配列番号 24) を用いて PCR 法により増幅した DNA 断片を、両 DNA 断片が共通に有する *Aor*51HI サイトを利用して連結して、マウス ST6Gal II の全長をコードする DNA 断片を得、クローニングベクター pBluescript II SK(+) に挿入した。図 8 A にマウスの ST6Gal II の配列情報を示す。マウス ST6Gal II は 524 ア

ミノ酸からなり、ヒト ST6Gal II より 5 アミノ酸ほどステム領域に相当する部分が短かった。なお本タンパク質の膜貫通ドメインは、疎水性分布図によりアミノ酸番号 12-30 の領域に存在することが予測された (図 8 B)。ヒトとマウスの ST6Gal II ではアミノ酸配列レベルで 77.1%の相同性を示した (図 9 B)。

つぎに ST6Gal II の酵素学的諸性質を調べるため、分泌型タンパク質の製造を行った。まずヒト ST6Gal II について、*Xho*I サイトを含む合成 DNA, 5'-TCATCTACTTCACCTCGAGCAACCCCGCTG-3' (図 7 A の塩基番号 255-284 に相当) (配列番号 25) を用いて膜貫通ドメイン直下流に *Xho*I サイトを導入し、これと pBluescript II SK(+) 由来の *Xho*I サイトを用いて ST6Gal II のステム領域と活性ドメインをコードする *Xho*I 断片を調製した。これを哺乳動物発現ベクター pcDSA の *Xho*I サイトに挿入した。この発現ベクターを pcDSA-hST6Gal II と命名した。またマウス ST6Gal II については、上記クローニングの際に用いた合成 DNA, 5'-CAATGAAACCACACTTGAAGCAATGGCGAC-3' (図 8 A の塩基番号 1-30 に相当) (配列番号 23) のかわりに、*Mun*I サイトを含む合成 DNA, 5'-CATCCAATTGACCAACAGCAATCCTGCGGC-3' (図 8 A の塩基番号 83-112 に相当) (配列番号 26) を用いてマウス ST6Gal II のステム領域と活性ドメインをコードする *Mun*I-*Xho*I 断片を調製した。これを pcDSA の *Eco*RI-*Xho*I サイトに挿入したものを、発現ベクター pcDSA-mST6Gal II と命名した。

pcDSA-hST6Gal II および pcDSA-mST6Gal II は、それぞれマウス免疫グロブリン IgM のシグナルペプチドと *Staphylococcus aureus* protein A, およびマウスまたはヒト ST6Gal II の活性ドメイン (ヒト ST6Gal II ではアミノ酸番号 33-529、マウス ST6Gal II ではアミノ酸番号 31-524) からなる分泌型融合タンパク質をコードする。

各発現ベクターとリポフェクトアミン (Invitrogen) を用いて COS-7 細胞でその一過性発現を行った (Kojima, N. *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 360, 1-4)。ここでそれぞれの発現ベクターを導入した細胞から細胞外に分泌された本発明のタンパク質を PA-hST6Gal II (ヒト) および PA-mST6Gal II (マウス) と命名した。

PA-hST6Gal II、PA-mST6Gal II は IgG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech 社) に吸着させて培地より回収した。シアル酸転移酵素活性は Lee らの方法に準じて以下のように行った (Lee, Y.-C. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 11958-11967)。50 mM MES バッファー (pH 6.0), 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5% Triton CF-54, 100 μ M CMP-[¹⁴C]-NeuAc, 基質糖鎖 (糖脂質の場合は 0.5 mg/ml, 糖タンパク質、オリゴ糖は 1 mg/ml になるように添加)、および PA-hST6Gal II または PA-mST6Gal II 懸濁液を含む反応液 (10 μ l) を 37 度で 3-20 時間インキュベートし、その後、糖脂質については C-18 カラム (Sep-Pak Vac 100 mg; Waters 社) を用いて精製したものを試料として、オリゴ糖、糖タンパク質については反応産物をそのまま試料として解析を行った。オリゴ糖、糖脂質はシリカゲル 60HPTLC プレート (Merck 社) にスポットし、1-プロパノール : アンモニア水 : 水 = 6:1:2.5 の展開溶媒 (オリゴ糖用) またはクロロホルム : メタノール : 0.02% CaCl₂ = 55:45:10 の展開溶媒 (糖脂質用) で展開した。糖タンパク質の場合は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析を行った。これらの放射活性を BAS2000 ラジオイメージアナライザー (フジフィルム) で可視化し、定量した。

表 2 に PA-hST6Gal II、PA-mST6Gal II の基質特異性を示す。

表 2 ST6Gal II の基質特異性

PA-hST6Gal II および PA-mST6Gal II を用いて様々な基質に対する特異性を検討した。各基質の濃度は、糖脂質の場合は 0.5 mg/ml に、糖タンパク質、単糖、オリゴ糖の場合は 1 mg/ml にした。相対活性は Galβ1,4GlcNAc の取り込み値を 100 として計算した。R は N 型糖鎖の残りの糖鎖部分を意味する。

Acceptors	Representative structures of carbohydrates	Relative rate (%)		
		Mouse ST6Gal II	Human ST6Gal II	Human ST6Gal I
Oligosaccharides				
Type II	Galβ1,4GlcNAc	100*	100**	100***
Type I	Galβ1,3GlcNAc	0	0	4.2
Type III	Galβ1,3GalNAc	0	0	0
Lactose	Galβ1,4Glc	0	0	8.7
Lacto-N-tetraose	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc	0	0	31.1
Lacto-N-neotetraose	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc	128.8	86.2	101.6
Glycoproteins				
Fetuin	NeuAcα2,3Galβ1,3GalNAc-O-Ser/Thr	0	0	13.0
	NeuAcα2,3Galβ1,3(NeuAcα2,6)GalNAc-O-Ser/Thr			
	NeuAcα2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R			
Asialofetuin		21.0	3.9	95.0
BSM	NeuAcα2,6GalNAc-O-Ser/Thr	0	0	0
	GlcNAcβ1,3(NeuAcα2,6)GalNAc-O-Ser/Thr			
Asialo-BSM		0	0	0
Ovomucoid	NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc-R	0	0	9.0
Asialoovomucoid		0	0	12.7
α1-Acid glycoprotein	NeuAcα2,6(3)Galβ1,4GlcNAc-R	0.75	1.2	37.1
Asialo-α1-Acid glycoprotein		12.3	1.2	93.0
Glycolipids				
Lactosylceramide	Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	0	0
GA1	Galβ1,3GalNAcβ1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	0	0
GM1a	Galβ1,3GalNAcβ1,4(NeuAcα2,3)Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	0	0
GM3	NeuAcα2,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	0	0
Paragloboside	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ1-Cer	0	0	0.3

*, 2.74 pmol/h/ml medium. **, 1.03 pmol/h/ml medium. ***, 8.14 pmol/h/ml medium. NeuAc, N-acetylneuraminic acid. Cer, ceramide.

両酵素ともオリゴ糖に対しては、非還元末端に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつものに対してのみ活性を示した(図 10)。またこの構造を持つと考えられる糖タンパク質に対しても弱い活性を示した。一方、糖脂質については、調べた範囲内では両酵素の基質となるものはなかった。また比較のためにヒト ST6Gal I のオリゴ糖に対する活性を調べたところ、Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつオリゴ糖のほかに、Lactose や Lacto-*N*-tetraose などに対しても活性を示した(図 10)。また ST6Gal I は糖タンパク質や糖脂質に対しても広い活性を示した(表 2)。以上のことは ST6Gal II が ST6Gal I よりも基質特異性に関してより選択性が強いことを意味する。なおヒト ST6Gal II の splicing variant である short form のタンパク質については、酵素活性が認められなかった(図 10)。

PA-hST6Gal II および PA-mST6Gal II により Gal β 1, 4GlcNAc にシアル酸を転移した場合、その反応産物の導入シアル酸は ST6Gal I の場合と同様に α 2, 3-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ(NANase I)では切断されなかったが、 α 2, 3-, α 2, 6-結合で結合しているシアル酸を特異的に切断するシアリダーゼ(NANase II)では切断された(図 11 A)。またこの反応産物は TLC において 6'-sialyl-*N*-acetyllactosamine と同じ移動度を示したこと、さらにガラクトシダーゼ処理では TLC において移動度に変化が認められなかったことから(図 11 B)、 α 2, 6 結合を介してガラクトースにシアル酸が導入された 6'-sialyl-*N*-acetyllactosamine であると考えられた。以上により ST6Gal II はシアル酸を α 2, 6-の結合様式でガラクトースに転移することが明らかになった。なおその特に好ましい基質としては、非還元末端に Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつオリゴ糖と考えられた。

またヒト ST6Gal I, ST6Gal II の様々な組織における発現パターンを、ST6Gal I 特異的プライマー (5'-TTATGATTACACCAACCTGAAG-3' (配列番号 27) および 5'-CTTTGTAAGTGTTCATGCTTAGG-3' (配列番号 28)、PCR 増幅断片の大きさは 372 bp) と ST6Gal II 特異的プライマー (5'-AGACGTCATTTGGTGGCCTGGG-3' (図 7 A の塩基番号 1264-1286 に相当) (配列番号 29) および 5'-TTAAGAGTGTGGAATGACTGG-3'

(図 7 A の塩基番号 1745-1765 に相当) (配列番号 30)、PCR 増幅断片の大きさは 502 bp) を用いて PCR 法で調べた (図 12 A)。ヒト ST6Gal I はほとんどの組織で発現していたが、ST6Gal II は小腸、大腸、胎児脳を除く組織での発現は非常に低いか、全く認められなかった。さらにヒト ST6Gal I は各種腫瘍細胞で発現していたが、ST6Gal II の発現は検出できなかった (図 12 B)。またマウス ST6Gal II の発現様式について、マウス ST6Gal II 特異的プライマー (5'-CAATGAAACCACACTTGAAGCAATGGCGAC-3' (図 8 A の塩基番号 1-30 に相当) (配列番号 23) および 5'-CGCAACAAAAAATAGCTATCTTCCTCGGG-3' (図 8 A の塩基番号 381-410 の相補鎖に相当) (配列番号 24)、PCR 増幅断片の大きさは 410 bp) を用いて同様に調べたところ、脳および胎生期でその発現が認められたが、その他の組織での発現は非常に低いか、全く認められなかった (図 12 C)。以上の結果は ST6Gal I と ST6Gal II が生体内で異なる役割を果たしていることを示唆する。

産業上の利用の可能性

本発明により新規酵素として O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素、および該酵素の活性部分を有し細胞外に分泌される新規蛋白質が提供される。本発明の酵素および蛋白質は、O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素活性を有するので、例えば、蛋白にヒト型の糖鎖を導入する試薬として有用である。また、本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、ヒトに特異的な糖鎖を欠く遺伝性疾患の治療のための医薬として有用である。さらに、本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、癌転移抑制、ウイルス感染防止、炎症反応抑制、神経組織賦活作用を目的とする医薬としても用いることが可能である。さらにまた、本発明の O-glycan α 2, 8-シアル酸転移酵素は、薬剤等にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させるための研究用試薬などとして有用である。

さらに本発明により新規酵素として β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素、および該酵素の活性部分を有し細胞外に分泌される新規蛋白質が提供される。本発明の酵素および蛋白質は β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素

活性を有するので、Gal β 1, 4GlcNAc 構造をもつオリゴ糖などのガラクトース上に α 2, 6 の結合様式でシアル酸をより選択的に導入することが可能になった。本発明の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素 ST6Gal II は、本酵素が合成する特異的な糖鎖を欠く遺伝性疾患の治療薬として、また癌転移抑制、ウイルス感染抑防止、炎症反応抑制、神経細胞賦活効果を有する薬剤として、あるいは糖鎖にシアル酸を付加することにより生理作用を増加させたり、糖鎖分解酵素の分解活性を阻害する研究用試薬などとして有用である。

請求の範囲

1. 以下の基質特異性および基質選択性を有することを特徴とする、O-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素。

基質特異性：末端に Sia α 2,3(6)Gal（ここで、Sia はシアル酸を示し、Gal はガラクトースを示す）構造をもつ糖を基質とする；

基質選択性：糖脂質およびN型糖鎖よりも優先的にO型糖鎖に対してシアル酸を取り込ませる；

2. 下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

3. 請求項2に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードするO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子。

4. 下記の何れかの塩基配列を有する請求項3に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列中の塩基番号77番目から1270番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285番目で特定される塩基配列；

(4) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列中の塩基番号92番目から1285

番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

5. 請求項3または4に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。

6. 発現ベクターである、請求項5に記載の組み換えベクター。

7. 請求項5または6に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

8. 請求項7に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項1または2に記載の酵素を採取することを特徴とする、請求項1または2に記載の酵素の製造方法。

9. 下記の何れかのアミノ酸配列を有するO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号26～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

(3) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号68～398から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、O-glycan α 2,8-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列；

10. 請求項1または2に記載のO-glycan α 2,8-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋

白であって、O-glycan $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質。

- 1 1. 請求項 9 又は 1 0 に記載の蛋白質をコードする遺伝子。
- 1 2. 請求項 1 1 に記載の遺伝子を含む組み換えベクター。
- 1 3. 発現ベクターである、請求項 1 2 に記載の組み換えベクター。
- 1 4. 請求項 1 2 または 1 3 に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

1 5. 請求項 1 4 に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項 9 または 1 0 に記載の蛋白質を採取することを特徴とする、請求項 9 または 1 0 に記載の蛋白質の製造方法。

1 6. 以下の作用および基質特異性を有することを特徴とする、 β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素。

(1) 作用；

末端にガラクトース $\beta 1, 4$ N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖のガラクトース部分に $\alpha 2, 6$ の結合様式でシアル酸を転移する。

(2) 基質特異性；

末端にガラクトース $\beta 1, 4$ N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質とし、ラクトース、及び末端にガラクトース $\beta 1, 3$ N-アセチルグルコサミン構造をもつ糖鎖を基質としない。

1 7. 下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素。

(1) 配列表の配列番号 5 または 7 に記載のアミノ酸配列；又は

(2) 配列表の配列番号 5 または 7 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

1 8. 請求項 1 7 に記載の β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素のアミノ酸配列をコードする β -ガラクトシド $\alpha 2, 6$ -シアル酸転移酵素遺伝子。

1 9. 下記の何れかの塩基配列を有する請求項 1 8 に記載の β -ガラクトシ

ド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子。

(1) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列；

(2) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列中の塩基番号176番目から1762番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

(3) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番目で特定される塩基配列；又は

(4) 配列表の配列番号8に記載の塩基配列中の塩基番号3番目から1574番目で特定される塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

20. 請求項18または19に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素遺伝子を含む組み換えベクター。

21. 発現ベクターである、請求項20に記載の組み換えベクター。

22. 請求項20または21に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

23. 請求項22に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項16または17に記載の酵素を採取することを特徴とする、請求項16または17に記載の酵素の製造方法。

24. 下記の何れかのアミノ酸配列を有する β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素活性ドメインから成る蛋白質。

(1) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列；

(2) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号33～529から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加

を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

(3) 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号31～524から成るアミノ酸配列；又は

(4) 配列表の配列番号7に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号31～524から成るアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有するアミノ酸配列：

25. 請求項16または17に記載の β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移酵素の活性ドメインであるポリペプチド部分とシグナルペプチドとを含む細胞外分泌型の蛋白であって、 β -ガラクトシド α 2, 6-シアル酸転移を触媒する活性を有する蛋白質。

26. 請求項24又は25に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

27. 請求項26に記載の遺伝子を含む組み換えベクター。

28. 発現ベクターである、請求項27に記載の組み換えベクター。

29. 請求項27または28に記載の組み換えベクターにより形質転換された形質転換体。

30. 請求項29に記載の形質転換体を培養し培養物から請求項24または25に記載の蛋白質を採取することを特徴とする、請求項24または25に記載の蛋白質の製造方法。

·A Mouse ST8Sia VI

B Human ST8Sia VI

1/12

2

A

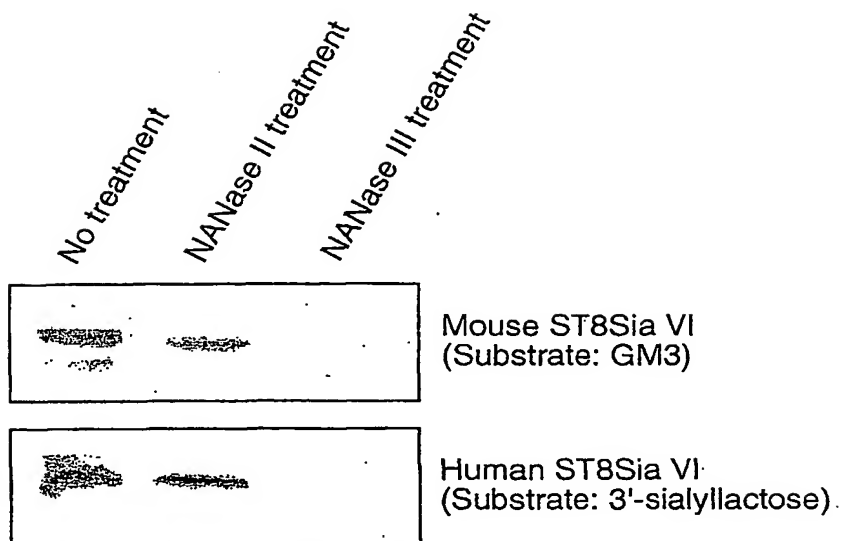
ST8Sia I	1	M--S--CG--FAHTSR-----G--AM--AM--AR---K--F--P--T--RL--PVC---A--	31
ST8Sia V	1	MRYADESANDILGNTLLFIIFCAFAVTLIQQILYSYIKF--GFQFGWQRGHOQANW	59
ST8Sia VI	1	-----MRSGGT--LFAITGSLMLLLLRMLWCPADAPAFSRLLMESSEHTSGTS	48
ST8Sia I	32	SAT-----C-V---VV--LCWLY-IF--HV-Y--R--PNEKEIVQG-VIA---QRT--A	66
ST8Sia V	60	TGIFNDSDSPTEQNTGSSRYFEFYDELEFNSTHCLELRCEIIEVKVISMVKQSEIIFE	119
ST8Sia VI	49	AAI--KTLWSPTTPVPRTRNSTYLD--ETTQITEKCKDLQYSLNSISNTRRYSEDDYI--Q	105
ST8Sia I	67	-WRT-N--Q---TS--ASLFFROMEDCCIPAHLEAMTKMNSHMCKSIWADGELLYSFTII	117
ST8Sia V	120	RWKSILICQWAMGASEASLFKSTISRCQNPFLFTTCKNTPVETNIRYEVESGLYHII	179
ST8Sia VI	106	TITNIGRCFWNRQAEYDNFRAKIASCCDAIQDQVVSQNNTPVGTNMSYEVESEKKHIFIR	165
ST8Sia I	118	NSTYSLEFQATE--FQLELKKCAVVGNGGILKMSGCARQIEPNFVMRCNLPHELSSEYTRD	176
ST8Sia V	180	QETIKMFHKEMFYRSQFKKCAVVGNGGILKMSGCKEINSADFVFRCNLPPISGIYTTI	239
ST8Sia VI	166	ENIHFHFVSQEFVDYHYNQCAVVGNGGILNKSLCCAEIDKSDVFVRCNLPETISASKI	225
ST8Sia I	177	VGSKTCLVTANPSIIRORFENI--LWSEKKEVDNMKIYNHSHYIYMPAFSMKTGTETPQLRVY	235
ST8Sia V	240	VGEKIDVTVNPSIITDRFHKLEKW--RRFEFSVLQRYENASVLLPARYNVNNTLVSFVRK	298
ST8Sia VI	226	VGSKTNLVTNPSIITLKYCNLKE--KKACLEDISTYGDFFLLLPAFSYRANTGISFKVY	284
ST8Sia I	236	YTLKIVGANCTVLHANENFLFNIGKFWKSRGIHAKRLSTGIFLVSAALGLCEEVSIYGFW	295
ST8Sia V	299	YMDIFQSRQEVYFFHHQYISSVSRYWLSLGVRRARFISTGLSLVTAALCEEVHIEGFW	358
ST8Sia VI	285	QTLHESKMRQKVLFFHRYLHLALFWRTKGVTAAYRLSTGLMIASVAVELCENVKLYGFW	344
ST8Sia I	296	PFSDVMQCDPISHHYDYNVLEFSQYHAMHBEFLQLWYLHKICALLMQLDPEPSPQPTS	355
ST8Sia V	359	AFPMNPSGFETTHHYDYNVKPKFGFHAMESEIFTFIRMHSRGILVHTGTQ--NCC-----	412
ST8Sia VI	345	PFSKTIEDTELSSHYYDNMLPKHGFHQMKEYSCMLQLHMRGIIKLQFSKCEA-----	398

B

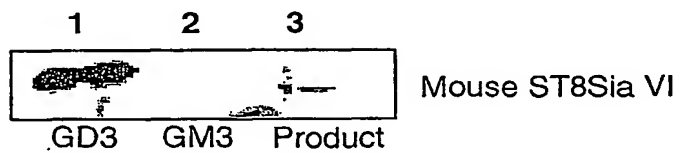
mST8Sia VI	1	MRSGGTIFALIGSIMLLLLLLRMLWCPADAPAFSRLLMESGREDTSGTSAALKTIWSETTP	60
hST8Sia VI	1	MRPGCAILAILASILLLLLLLRLLWCPADAFCAFILVESREATHGTFAALRTIRSHATA	60
mST8Sia VI	61	VPRTRNSTYIDENKTTQITEKCKDLQYSLNSLSNKTTRYSEDDYLCITINIGRCFWNRQAF	120
hST8Sia VI	61	VPRATNSTYINEKSLQITEKCKNLQYSGIESFSNKTGKYSENDDYLCITIDICSCPWKROAF	120
mST8Sia VI	121	EYDNFRAKLASCCDAIQDQVVSQNNTPVGTNMSYEVESEKKHIFIRENIFHMFVVSQPFVI	180
hST8Sia VI	121	EYANFRAKLASCCDAVQNFVVSQNNTPVGTNMSYEVESEKKHIFIKKNIFHMFVVSQPFVI	180
mST8Sia VI	181	YPYNQCAVVGNGGILNKSLCCAEIDKSDVFVRCNLPETITGSAKSDVGSKTNLVTNPSII	240
hST8Sia VI	181	YPYNQCAVVGNGGILNKSLCCTEIDKSDVFVRCNLPETITGSDVSKDVGSKTNLVTINPSII	240
mST8Sia VI	241	TLKYCNLKEKKAQFLEDISTYGDARLLLPAFSYRANTGISFKVYQTIKESKMRQKVLFFH	300
hST8Sia VI	241	TLKYCNLKEKKAFLFLEDIATYGDARFLLPASFRRANTGTISFKVYVTIEESKMRQKVLFFH	300
mST8Sia VI	301	ERYIRHLALFWRTKGVTAAYRLSTGLMIASVAVELCENVKLYGFWPFPSKTEITELSSHYY	360
hST8Sia VI	301	EKYIKDLALFWRTKGVTAAYRLSTGLMTTSVAVELCKNVKLYGFWPFPSKTEITELSSHYY	360
mST8Sia VI	361	DNMLPKHGFHQMPKEYSCMLQLHMRGILKLQFSKCEA	398
hST8Sia VI	361	DNKLPKHGFHQMPKEYSCILQLHMRGILKLQFSKCEA	398

図3

A



B



4

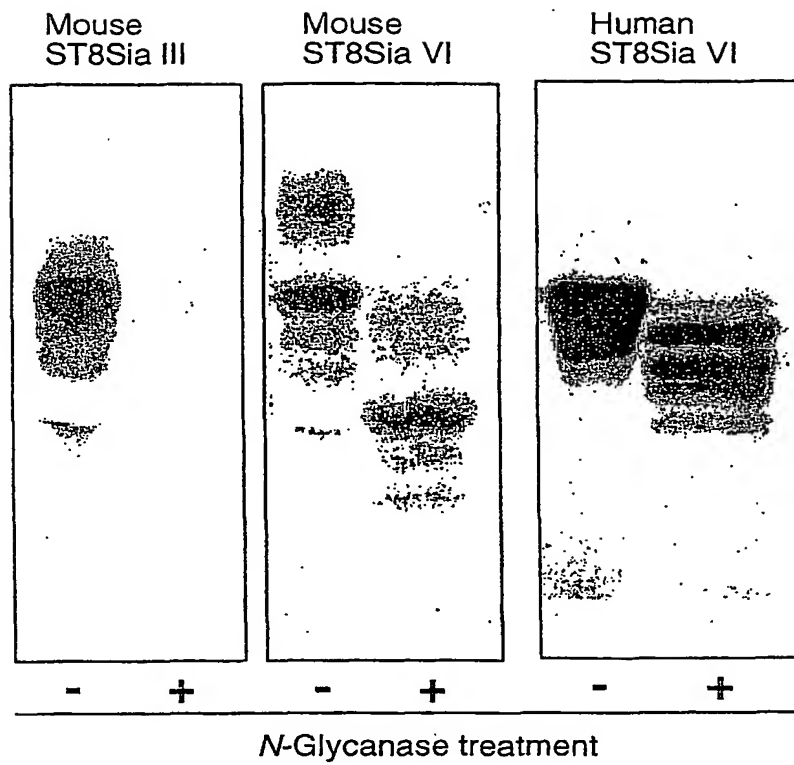
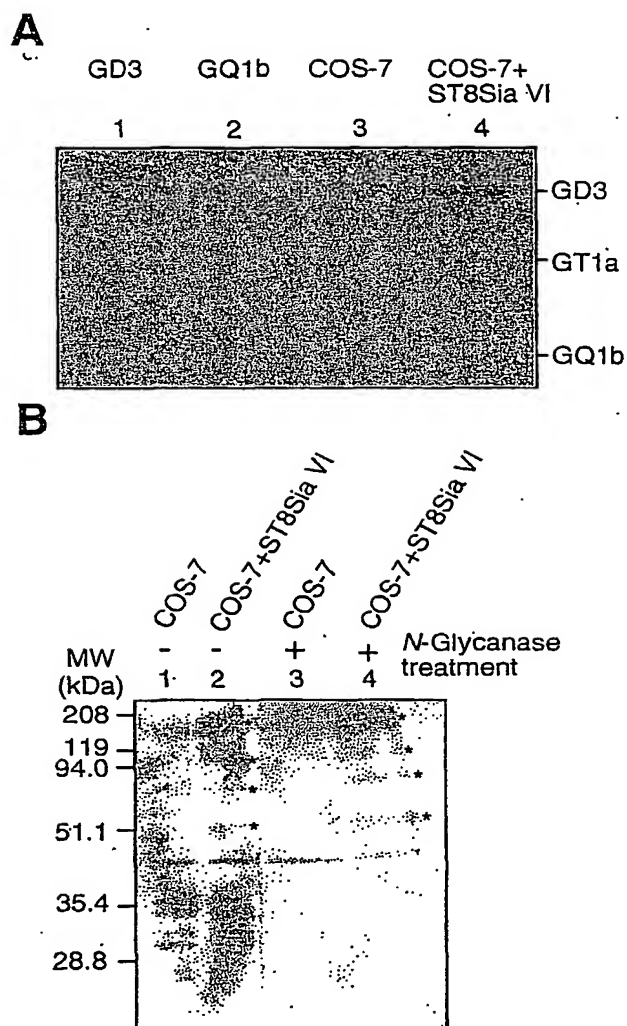
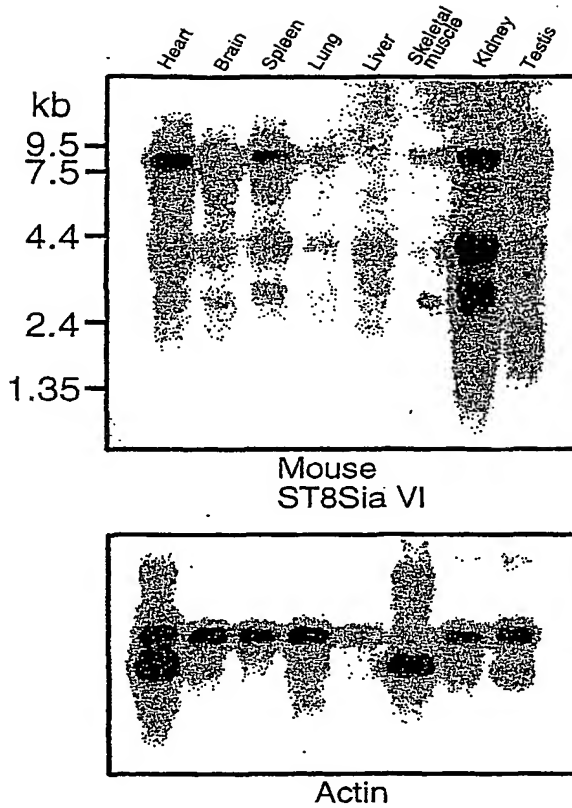


図 5

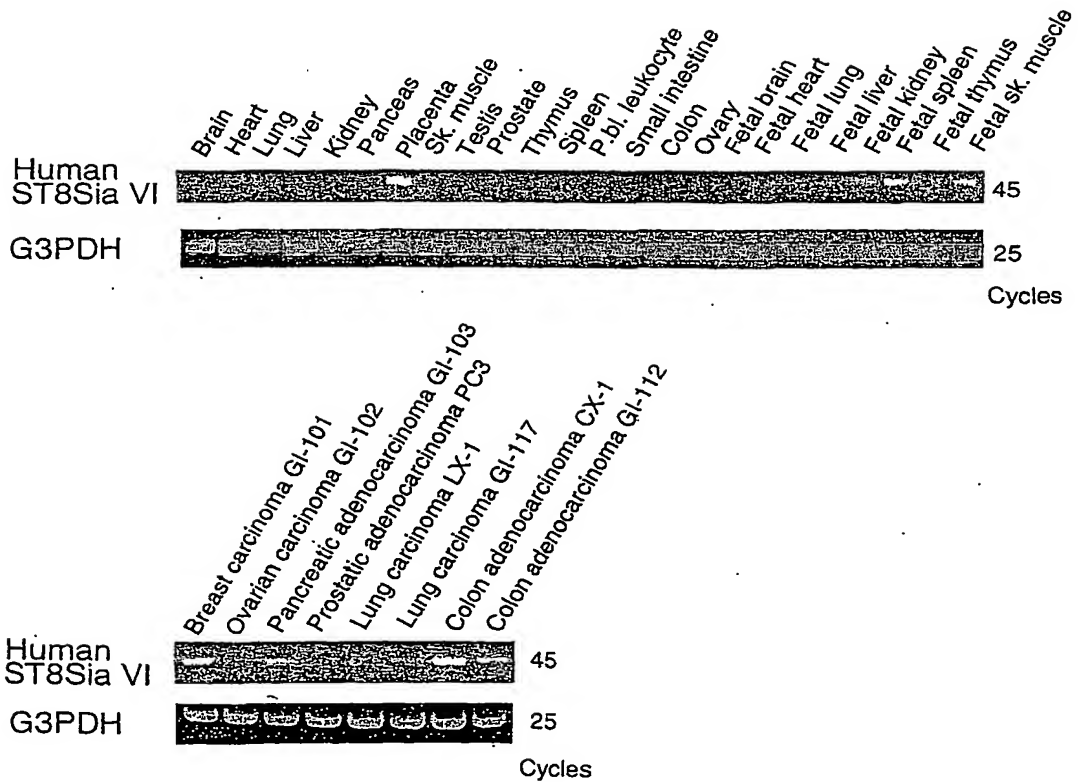


6

A



B



7

A

Human ST6Gal II

```

ggcgccgggactccctcctggcgccacagcctgtgcgcatctctgcattcctgcgcgcgcgggacccgagccccggagggtgtccaggcgcggtgc 100
caggcggggtactgtgcaggttcattctgccacccatctgcattaaagacacaaggtgctgaccgcagagacctgccatgaaccacacttgaagcaatgga 200
                                     M K P H L R Q W R
gacaacgaatgcttttcggaatattcgcttgggggctcctctttttgtgattttcatctacttcaccgacagcaaccccgctgagcctgtaccagctc 300
Q R M L F G I F A W G L L F L L I F I Y F T D S N P A E P V P S S
cctctccttctctggagaccaggaggctcctgcccgtgcagggaagcagcgggccatcatggcgccgcacatgagccctccccgctgggggcttgac 400
L S F L E T R R L L P V Q G K Q R A I M G A A H E P S P P G G L D
gcacgccaggcgctgccccgcgccacccagccggttccctttcatgcggggcctggagacctgcagaaatggggccagtcaccaagatgggttgaacata 500
A R Q A L P R A H P A G S F H A G P G D L Q K W A Q S Q D G F E H K
aagagttttttcatccaggtggggagaaaatctcaaagtgttctaccggaggatgacgactactttttgtgtgtgtcagccaggggtggcacag 600
E F F S S Q V G R K S Q S A F Y P E D D D Y F P A A G Q P G W H S
ccacactcaggggacattgggattcccttccccggggagccagggccacgggggggcttttcgggtgcacaggtccagaggaggcggtgagaag 700
H T Q G T L G F P S P G E P G P R E G A F P A A Q V Q R R R V R K
aggcaccggaggcagagaaggagcagtggttgaggaggggcagcagcgacaggtgtactctccatgtccagggccttctgtaccggctctgga 800
R H R R Q R S H V L E E G D G A C L Y S S M S R A P L Y R K W
aggggaacgtctcttccaaaatgctgaacccgcgctgcagaaggcgatgaagattacctgacgccaacaagcaggggtgcgttcccggggaagcg 900
G N V S S K M L N P R L Q K A M K D Y L T A N K H G V R F R G K R
ggaggccgggtgagcagggcacagctgtgtgcagctgcgggagcgcgcgctgcggacgctggacggcaccgaggcgcccttttctgcgtgggc 1000
E A G L S R A Q L L C Q L R S R A R V R T L D G T E A P P S A L G
tgccggcgctgtgtcccgccgtgcccctgagccagctgcaccccgcgccgtgcgagctgcgtgtcgtcatgtctgcaggcgcaatcctcaactctt 1100
W R R L V P A V P L S Q L H P R G L R S C A V V M S A G A I L N S S
ccttggggcaggaaatagattctcatgatgcggttttgagatttaactctgctcctacacgtggttatgagaagatgttgggaataaaaccaccatc 1200
L G E E I D S H D A V L R F N S A P T R G Y E K D V G N K T T I R
catcattaattcgcagattctgaccaacccagccatcacttcattgacagttcactgtataaagacgtcattttggtggcctgggaccctgccccatc 1300
I I N S Q I L T N P S H H F I D S S L Y K D V I L V A W D P A P Y
tccgaaatcttaacctgtgtacaaaaaacggattacaacctgttccatccatattcagcatcgctcagagaaacccaatcagccattttacattc 1400
S A N L N L W Y K K P D Y N L P T P Y I Q H R Q R N P N Q P F Y I L
ttcatcctaaatttatatggcagctctgggatattatccaggagaacactaaagagaagattcaaccaaacccaccatcttctggttccattggaatcct 1500
H P K F I W Q L W D I I Q E N T K E K I Q P N P P S S G F I G I L
catcatgatgtccatgtgcagagagggtgcacgtgtatgaatatatcccatccgtgcggcagacggagctgtgccactaccacgagctgtactacgacga 1600
I M M S M C R E V H V Y I P S V R Q T E L C H Y H E L Y Y D A
gcctcaccctcggggcggtaccacccactactctatgagaagctcctgtgcagcgccctgaacatggggcagcagggggatltgcatcgcaagggaagg 1700
A C T L G A Y H P L L Y E K L L V T G R L N M G T Q G D L H R K G K V
tggttcttctcgtctccaggcggtgcactgcctgcaccaagtcagtcattccacactcttaaaagggtttcttgggaatcaatgtgcaataaggta 1800
V L P G F Q A V H C P A P S P V I P H S *

```

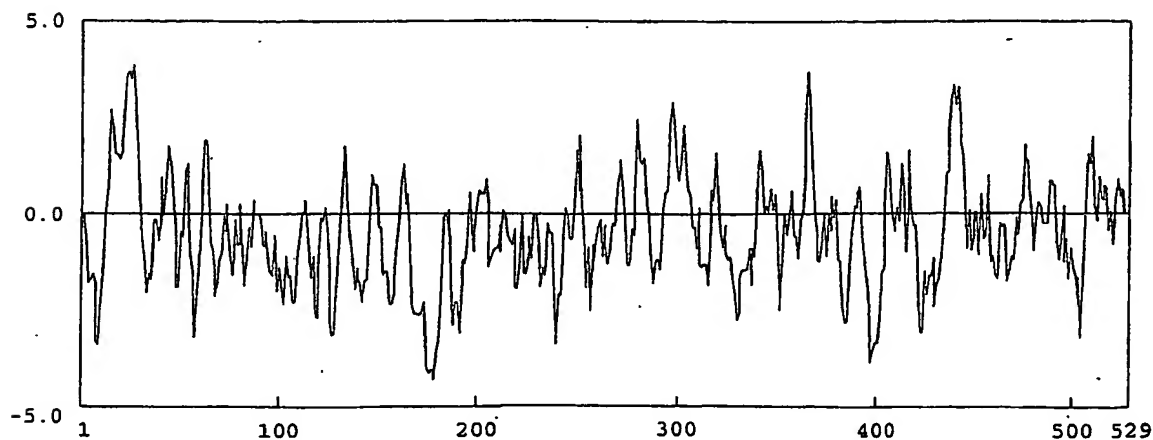
Short form

```

ttcatcctaaatttatatggcagctctgggatattatccaggagaacactaaagagaagattcaaccaaacccaccatcttctggtttcattggctcatt 1500
H P K F I W Q L W D I I Q E N T K E K I Q P N P P S S G F I G S F
tgtaaaaattggccatcatcagagcttgagtgagcagatcacgcgactgcactccagcctggacgacagagtgagactccatctcaaaaaaaaaa 1600
V K I G H I R A C S E P R S R D C T P A W T T E *

```

B



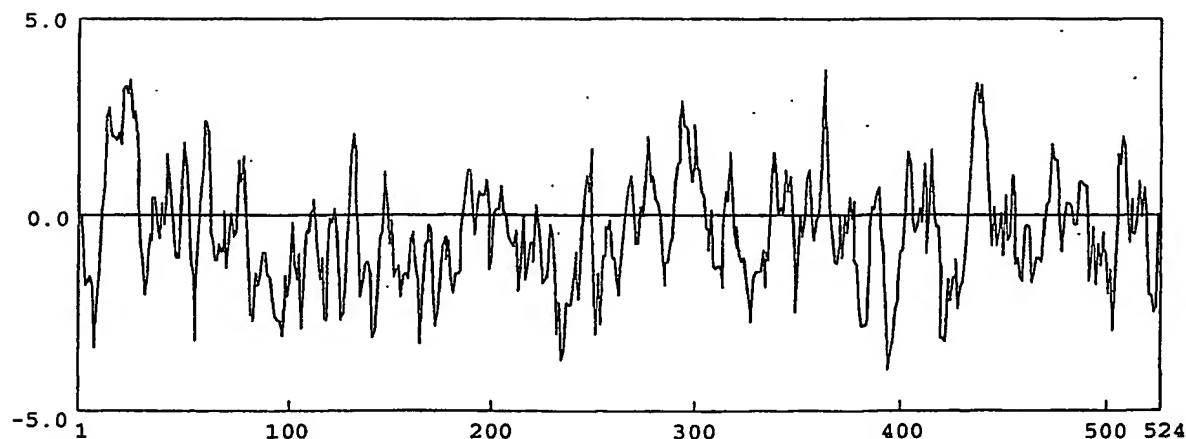
8

A

Mouse ST6Gal II

CAATGAAACCACTTGAAGCAATGGCGACAACGAATGCTCTTTGGAATATTGTTTGGGGGCTCCTCTTTTGGCAATTTTCATCTACTTACCAACAG	100
M K P H L K Q W R Q R M L F G I F V W G L L F L A I F I Y F T N S	33
CAATCTGCGGCACCTATGCCAGCTCCTTTTCCTTCTGGAGAGCCGTGGGCTCCTGCCTCTACAGGGCAAGCAGCGGGTCATCATGGGCGCTTTGCAG	200
N P A A P M P S S P S F L E S R G L L P L Q G K Q R V I M G A L Q	66
GAACCTCTTTGCCAGAACTTGGATGCAAGCAAGTGCTTCTGGACAGCCACCTTGAGAACCTTTCCACCCTTGGCTGGGGACCCACAGAAATGGG	300
E P S L P R S L D A S K V L L D S H P E N P F H P W P G D P Q K W D	100
ATCAGGCCCAATGGCTTTGCAATGGGGATGAGTTTTTTCATCCCAGTTGGGAGGAAATCACAAGCGCTTTCTATCCCGAGGAAGATAGCTATTT	400
Q A P N G F D N G D E F F T S Q V G R K S Q S A F Y P E E D S Y F	133
TTTTGTGCGGATCAGCTGAGTTGTACCACACAGGCGAGGGTGCACTGGAGCTGCCATCTCCAGGGGAGACATCATGGCGATCAGGACCTGTTACGCCC	500
F V A D Q P E L Y H H R Q G A L E L P S P G E T S W R S G P V Q P	166
AAGCAGAAGCTGCTTCAACCAAGCGAGGCGAGCTTGCCTGAGGAAAGCTATGACAGCGACATGCTGTACGCTCCATGTGAGAGCCTTCTGTACCGGC	600
K Q K L L H P R R G S L P E E A Y D S D M L S A S M S R A F L Y R L	200
TCTGGAAGGGGCGCTGTCTTAAGATGTTGAACCCGCGCTGCAAGAGCCATGCGTTACTACATGCTTCAACAGCATGCTGTGCGCTTCCGCGAG	700
W K G A V S S K M L N P R L Q K A M R Y Y M S F N K H G V R F R R	233
GCGGGTGGGCTGAAGCTACACGTACAGGCGCGAGCTGCTGTGAGATGCGCAGACGTGTGCGTGTGCGCAGCTTGGACGGCAGAGGCGCCCTTC	800
R G R R E A T R T G P E L L C E M R R R V R V R T L D G R E A P F	266
TCGGGGTGGGCTGGCGGCTCTGGTACAGGTGTACCTCTGAGCCAGTTGCACCCGCGGCTCTGAGCAGCTGGCGAGTTGTCTGTCTGCGGTGCCA	900
S G L G W R P L V P G V P L S Q L H P R G L S S C A V V M S A G A I	300
TCCTGAACCTCCTCTGGGGGAGAAATCGATTCTCATGATGTCAGTTTGTAGATTAACTTGCCTTACCCGCTGGCTACGAGAAAGATGTCGGAATAA	1000
L N S S L G E E I D S H D A V L R F N S A P T R G Y E K D V G N K	333
AACCACAGTACGCATCATTAATTTCTAGATTCTGGCCAACCCAGCCATCACTTCAATTGACAGTGCTTTATATAAAGATGTTATCTGGTAGCCTGGGAT	1100
T T V R I I N S Q I L A N P S H H F I D S A L Y K D V I L V A W D	366
CCTGCTCTTATTTGCAATCTTAACCTGTGGTATAAGAAGCCAGATTACAACCTTTTCACTCCATATATCCAGCATGCGCGGAAATACCCGAGTCAGC	1200
P A P Y S A N L N L W Y K K P D Y N L P T P Y I Q H R R K Y P T Q P	400
CATTTTACATTTTCAACCAAGTTTCATATGGCAGCTTTGGGACATTATCCAGGAGAATACAAGGAGAATACAGCCCAACCCACCATCTTTCTGGTTT	1300
F Y I L H P K F I W Q L W D I I Q E N T R E K I Q P N P P S S G F	433
TATTGGAATCTCATCATGATGTCATGTGTAAAGAGGTGCAGGTGTATGATACATCCCATCTGTTGACAGACAGAGCTTTGGCACTACCATGAGCTG	1400
I G I L I M M S M C K E V H V Y E Y I P S V R Q T E L C H Y H E L	466
TACTACGACGCGAGCTGCACTTGGGGGCTTACCCCACTGCTCTATGAAAAGCTACTGTTGACGCGCTTAACACAGGCACCCAGGCAGACTTGCATC	1500
Y Y D A A C T L G A Y H P L L Y E K L L V Q R L N T G T Q A D L H H	500
ACAAGGGCAAGGTAGTCTTGCAGGCTTCCAGACCTTCCGTTGTCAGTAACAGGCCCAACAATACACATCTTAAATGGAACCTTTGGGAACGTATG	1600
K G K V V L P G F Q T L R C P V T S P N N T H S *	524
TGCAATAAGGT	1611

B



9

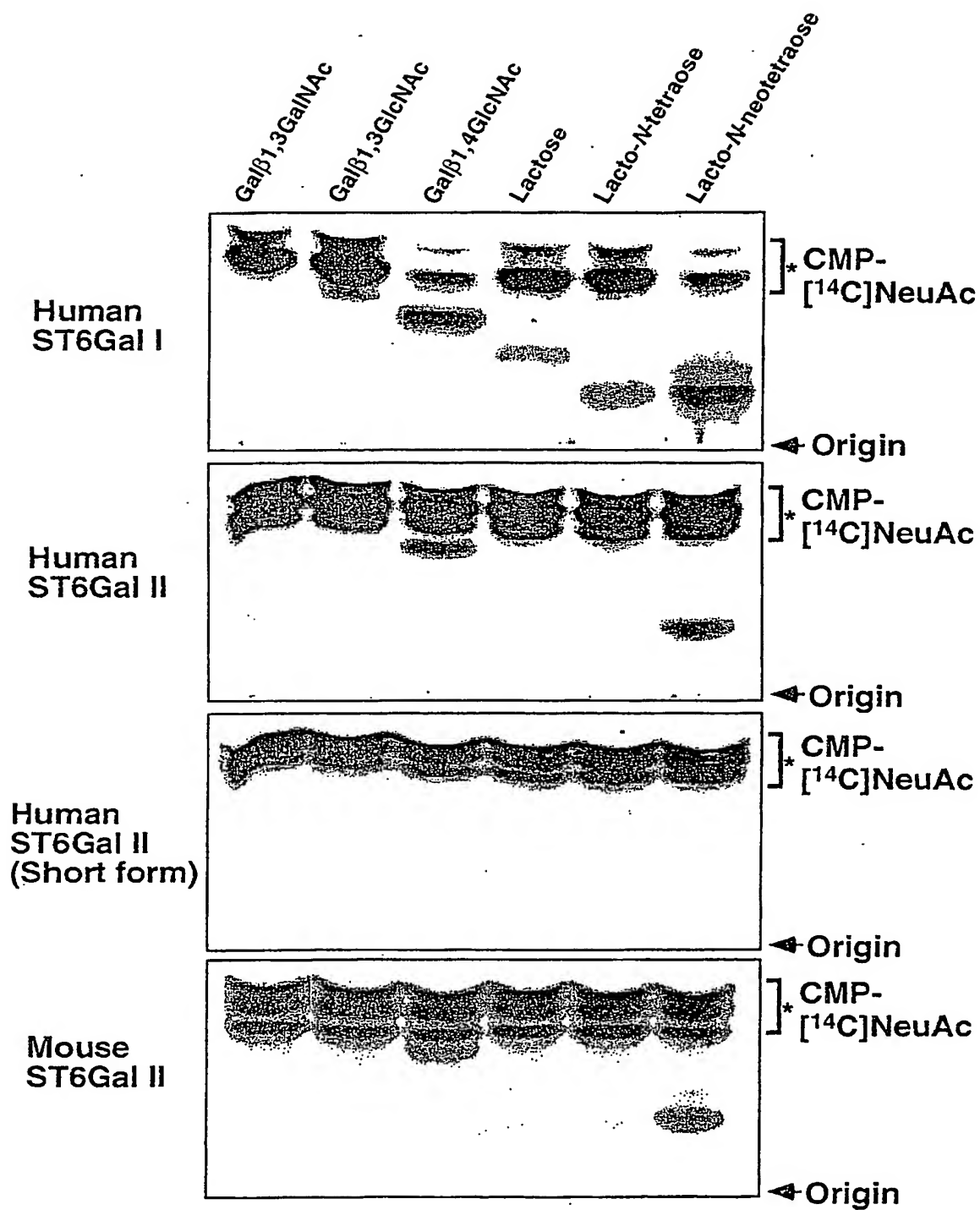
A

ST6Gal I	1	M-IH-TNLKKKFSCCVLVF-LLFAVICV-WKEKKKG-SYYDSFK-LQTKFQVLKSLGKL	54
ST6Gal II	1	MKPHLKQWRQRMFLGIFAWGLLELLFIYFTDSNPAEPVPSLSFLERRLLPVQKQRA	60
ST6Gal I	55	AMGSDSQSVSSSSTQDPHRGRQTLGSLRGLAKAKPEAS-----	92
ST6Gal II	61	IMGAHEPSPPGGLDARQALPRAHPAGSFHGGPGDLQKWAQSQDGFHEKFEFSSQVGRKS	120
ST6Gal I	93	-----	92
ST6Gal II	121	QSAFYPEDDDYFFAAGQPGWHSHTQGTGLGFPSPGEPGREGAFPAQVQRRRVKRRHRQ	180
ST6Gal I	93	-----FQVMNKDSSSKNLIERLQKIWKNYLSMNKYKVSYK	128
ST6Gal II	181	RRSHVLEEGDDGDRLYSSMSRAFLYRLKGNVSSKMLNPRLOKAMKDYITANKHGVRFRG	240
ST6Gal I	129	PGPGIKFSAAELRCHLRDHVNVSMVEVDFPNTSEMEGYLPKESIRTKAGFWG--RCAV	186
ST6Gal II	241	K-REAGLSRAQLLQQLSRAVRRTLDGTEAPFSALGWRRLVFAVPL-SQLHPRGLRSCAV	298
ST6Gal I	187	VMSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFNAPTANPQQDVGTKTIRLMNSQLVTI-TEKRELFK	245
ST6Gal II	299	VMSAGAILNSSLGEEIDSHDAVLRFNAPTANPQQDVGTKTIRLMNSQLVTI-TEKRELFK	358
ST6Gal I	246	DSLYNEGILIVWDFSVVHSDIPKWIQNPDPYFNNKTYRKLHNPQFFYLKFPMPWELW	305
ST6Gal II	359	SSLYKDVILVAWDPAFYSANLNLWYKKPDYNLFTPIQHRQRNENQFFYLKFPMPWELW	418
ST6Gal I	306	DIIDQHSIPSEIQPNPPSSGFIGILIMMSMREHVHYEYIPSVRQTELCHYHELYYDAAC	365
ST6Gal II	419	DIIDQHSIPSEIQPNPPSSGFIGILIMMSMREHVHYEYIPSVRQTELCHYHELYYDAAC	478
ST6Gal I	366	MLGAYHPLLYEKLLVQRLNMTQGLHRKKGKVVLPGFQAVHCHAPSPVIPHS	406
ST6Gal II	479	MLGAYHPLLYEKLLVQRLNMTQGLHRKKGKVVLPGFQAVHCHAPSPVIPHS	529

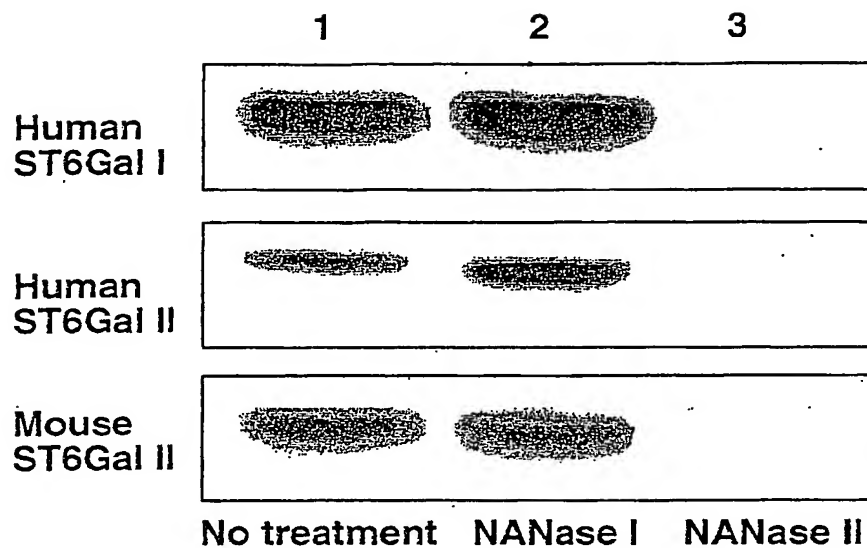
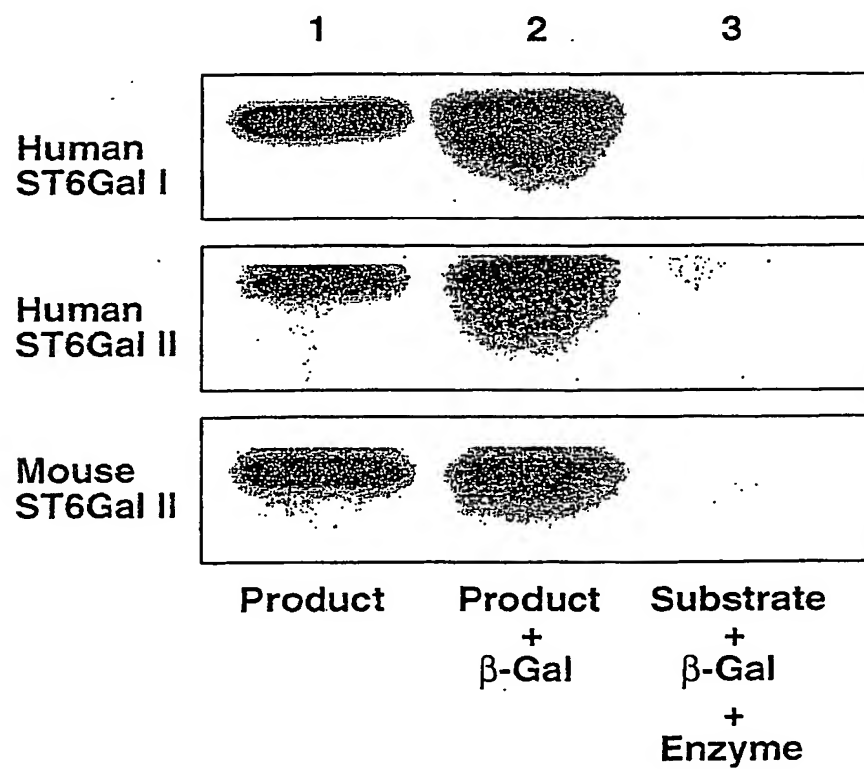
B

hST6Gal II	1	MKPHLKQWRQRMFLGIFAWGLLELLFIYFTDSNPAEPVPSLSFLERRLLPVQKQRA	60
mST6Gal II	1	MKPHLKQWRQRMFLGIFVWGLLFLAIFIIYFTNSNPAAPMPSSSFLERRLLPVQKQRA	60
hST6Gal II	61	IMGAHEPSPPGGLDARQALPRAHPAGSFHAGPGDLQKWAQSQDGFHEH-KEFFSSQVGRK	119
mST6Gal II	61	IMGALQEPSSLERSLDASKVLLDSHFENPFHPWGGDPQKWDQAPNGFDNGDEFFTSQVGRK	120
hST6Gal II	120	QSAFYPEDDDYFFAAGQPGWHSHTQGTGLGFPSPGEPGREGAFPAQVQRRRVKRRHRR	179
mST6Gal II	121	QSAFYPEDDDSYFFVADQFELYHHRQALQLSPGETSWRSS--E--VQPKQ-KLLH--	172
hST6Gal II	180	QRRSHVLEEGDDGDRLYSSMSRAFLYRLWKGNVSSKMLNPRLOKAMKDYITANKHGVRFR	238
mST6Gal II	173	PRRGSLEPAAYSMSMSRAFLYRLWKGAVSSKMLNPRLOKAMRYMSFNKHGVRFR	232
hST6Gal II	239	-RCKREAGLSRAQLLQQLSRAVRRTLDGTEAPFSALGWRRLVFAVPLSQLHPRGLRSCA	297
mST6Gal II	233	RRGRREARTRTGPPELLCEMRRVRVVRTLDGTEAPFSALGWRRLVFAVPLSQLHPRGLRSCA	292
hST6Gal II	298	VMSAGAILNSSLGEEIDSHDAVLRFNAPTANPQQDVGTKTIRIINSQILNPSHHFI	357
mST6Gal II	293	VMSAGAILNSSLGEEIDSHDAVLRFNAPTANPQQDVGTKTIRIINSQILNPSHHFI	352
hST6Gal II	358	DSLYKDVILVAWDPAFYSANLNLWYKKPDYNLFTPIYQHRQRNENQFFYLHPKFIWQL	417
mST6Gal II	353	DSALYKDVILVAWDPAFYSANLNLWYKKPDYNLFTPIYQHRQRNENQFFYLHPKFIWQL	412
hST6Gal II	418	WDIIQENTREKIQPNPPSSGFIGILIMMSMREHVHYEYIPSVRQTELCHYHELYYDAAC	477
mST6Gal II	413	WDIIQENTREKIQPNPPSSGFIGILIMMSMREHVHYEYIPSVRQTELCHYHELYYDAAC	472
hST6Gal II	478	TLGAYHPLLYEKLLVQRLNMTQGLHRKKGKVVLPGFQAVHCHAPSPVIPHS	529
mST6Gal II	473	TLGAYHPLLYEKLLVQRLNMTQGLHRKKGKVVLPGFQAVHCHAPSPVIPHS	524

☒ 1 0



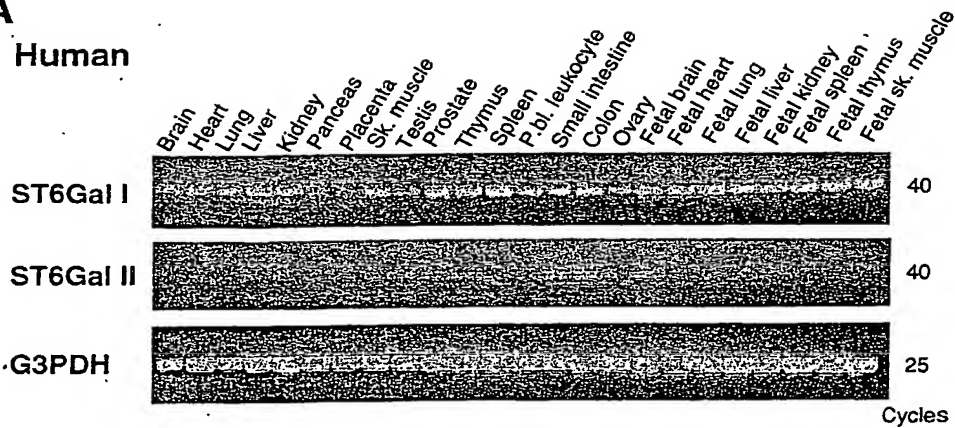
☒ 1 1

A**B**

1 2

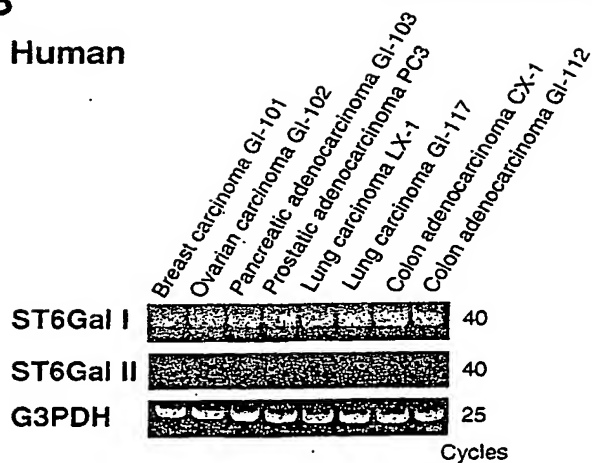
A

Human



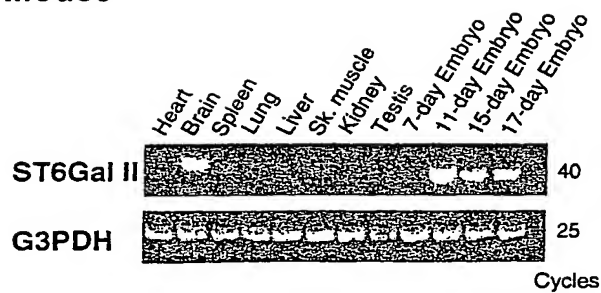
B

Human



C

Mouse



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Sugar chain synthetase

<130> A21774A

<160> 30

<210> 1

<211> 398

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Arg Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ala Leu Ile Gly Ser Leu Met Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Arg Met Leu Trp Cys Pro Ala Asp Ala Pro Ala Arg

20 25 30

Ser Arg Leu Leu Met Glu Gly Ser Arg Glu Asp Thr Ser Gly Thr Ser

35 40 45

Ala Ala Leu Lys Thr Leu Trp Ser Pro Thr Thr Pro Val Pro Arg Thr

50 55 60

Arg Asn Ser Thr Tyr Leu Asp Glu Lys Thr Thr Gln Ile Thr Glu Lys

65 70 75 80

Cys Lys Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Asn Ser Leu Ser Asn Lys Thr Arg

85 90 95

Arg Tyr Ser Glu Asp Asp Tyr Leu Gln Thr Ile Thr Asn Ile Gln Arg

100 105 110

Cys Pro Trp Asn Arg Gln Ala Glu Glu Tyr Asp Asn Phe Arg Ala Lys

115 120 125

Leu Ala Ser Cys Cys Asp Ala Ile Gln Asp Phe Val Val Ser Gln Asn

130 135 140

Asn Thr Pro Val Gly Thr Asn Met Ser Tyr Glu Val Glu Ser Lys Lys

145 150 155 160
His Ile Pro Ile Arg Glu Asn Ile Phe His Met Phe Pro Val Ser Gln
 165 170 175
Pro Phe Val Asp Tyr Pro Tyr Asn Gln Cys Ala Val Val Gly Asn Gly
 180 185 190
Gly Ile Leu Asn Lys Ser Leu Cys Gly Ala Glu Ile Asp Lys Ser Asp
 195 200 205
Phe Val Phe Arg Cys Asn Leu Pro Pro Ile Thr Gly Ser Ala Ser Lys
 210 215 220
Asp Val Gly Ser Lys Thr Asn Leu Val Thr Val Asn Pro Ser Ile Ile
225 230 235 240
Thr Leu Lys Tyr Gln Asn Leu Lys Glu Lys Lys Ala Gln Phe Leu Glu
 245 250 255
Asp Ile Ser Thr Tyr Gly Asp Ala Phe Leu Leu Leu Pro Ala Phe Ser
 260 265 270
Tyr Arg Ala Asn Thr Gly Ile Ser Phe Lys Val Tyr Gln Thr Leu Lys
 275 280 285
Glu Ser Lys Met Arg Gln Lys Val Leu Phe Phe His Pro Arg Tyr Leu
 290 295 300
Arg His Leu Ala Leu Phe Trp Arg Thr Lys Gly Val Thr Ala Tyr Arg
305 310 315 320
Leu Ser Thr Gly Leu Met Ile Ala Ser Val Ala Val Glu Leu Cys Glu
 325 330 335
Asn Val Lys Leu Tyr Gly Phe Trp Pro Phe Ser Lys Thr Ile Glu Asp
 340 345 350
Thr Pro Leu Ser His His Tyr Tyr Asp Asn Met Leu Pro Lys His Gly
 355 360 365

Phe His Gln Met Pro Lys Glu Tyr Ser Gln Met Leu Gln Leu His Met

370

375

380

Arg Gly Ile Leu Lys Leu Gln Phe Ser Lys Cys Glu Thr Ala

385

390

395

<210> 2

<211> 3166

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

cggagcggcg agtcggtgcc gcccgggctg cgcttcgccc cggcagcttt ggcggcgagg 60

acgcccgtgg ctcagg atg aga tcg ggg ggc acg ctg ttc gcc ctc ata 109

Met Arg Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ala Leu Ile

1

5

10

ggc agc ctg atg ctg ctg ctc ctc ctg cgt atg ctc tgg tgc cca gcc 157

Gly Ser Leu Met Leu Leu Leu Leu Leu Arg Met Leu Trp Cys Pro Ala

15

20

25

gac gcg cct gcc cgc tcc agg ctg ttg atg gag gga agc aga gag gac 205

Asp Ala Pro Ala Arg Ser Arg Leu Leu Met Glu Gly Ser Arg Glu Asp

30

35

40

acc agt ggt acc tca gct gca ctg aag aca ctc tgg agc ccg aca acc 253

Thr Ser Gly Thr Ser Ala Ala Leu Lys Thr Leu Trp Ser Pro Thr Thr

45

50

55

ccg gta cca cgc acc agg aac agc aca tat ctg gat gag aag aca acc 301

Pro Val Pro Arg Thr Arg Asn Ser Thr Tyr Leu Asp Glu Lys Thr Thr

60

65

70

75

caa ata aca gag aaa tgc aaa gat ctg caa tat agc ttg aac tct tta 349

Gln Ile Thr Glu Lys Cys Lys Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Asn Ser Leu

80

85

90

tct aac aaa acg aga cgg tac tct gag gat gac tac ctc cag acc atc	397
Ser Asn Lys Thr Arg Arg Tyr Ser Glu Asp Asp Tyr Leu Gln Thr Ile	
95 100 105	
aca aac ata cag aga tgc cca tgg aac cgg caa gca gaa gaa tat gac	445
Thr Asn Ile Gln Arg Cys Pro Trp Asn Arg Gln Ala Glu Glu Tyr Asp	
110 115 120	
aat ttt aga gca aaa ctg gct tcc tgt tgc gat gcc att caa gac ttc	493
Asn Phe Arg Ala Lys Leu Ala Ser Cys Cys Asp Ala Ile Gln Asp Phe	
125 130 135	
gtg gtt tcc cag aac aac act cca gtg ggg act aac atg agc tac gag	541
Val Val Ser Gln Asn Asn Thr Pro Val Gly Thr Asn Met Ser Tyr Glu	
140 145 150 155	
gtg gaa agc aag aaa cac atc ccc att cga gag aac att ttc cac atg	589
Val Glu Ser Lys Lys His Ile Pro Ile Arg Glu Asn Ile Phe His Met	
160 165 170	
ttt cca gtg tgc cag cct ttt gtg gac tat ccc tat aac cag tgt gca	637
Phe Pro Val Ser Gln Pro Phe Val Asp Tyr Pro Tyr Asn Gln Cys Ala	
175 180 185	
gtg gtt ggt aat ggg gga att ctc aac aag tct ctc tgc gga gca gaa	685
Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Lys Ser Leu Cys Gly Ala Glu	
190 195 200	
att gat aaa tct gac ttc gtc ttc agg tgt aac ctc ccc cca atc aca	733
Ile Asp Lys Ser Asp Phe Val Phe Arg Cys Asn Leu Pro Pro Ile Thr	
205 210 215	
ggg agc gct agt aaa gat gtt gga agc aaa aca aat ctt gtg act gtc	781
Gly Ser Ala Ser Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Asn Leu Val Thr Val	
220 225 230 235	

aat ccc agc att ata acc ctg aag tac cag aat ttg aag gag aag aaa 829
Asn Pro Ser Ile Ile Thr Leu Lys Tyr Gln Asn Leu Lys Glu Lys Lys
240 245 250

gca cag ttt ttg gag gac atc tcc acc tat gga gat gca ttc ctc ctc 877
Ala Gln Phe Leu Glu Asp Ile Ser Thr Tyr Gly Asp Ala Phe Leu Leu
255 260 265

ctg cca gca ttt tcc tat cgg gcc aac aca ggc atc tct ttt aaa gtc 925
Leu Pro Ala Phe Ser Tyr Arg Ala Asn Thr Gly Ile Ser Phe Lys Val
270 275 280

tac caa aca ctc aaa gag tca aaa atg agg caa aag gtt ctc ttc ttc 973
Tyr Gln Thr Leu Lys Glu Ser Lys Met Arg Gln Lys Val Leu Phe Phe
285 290 295

cat ccc agg tac ctg aga cac ctc gct ctt ttc tgg aga act aaa ggg 1021
His Pro Arg Tyr Leu Arg His Leu Ala Leu Phe Trp Arg Thr Lys Gly
300 305 310 315

gtg act gca tac cgc ttg tcc aca ggc ttg atg att gca agt gtc gct 1069
Val Thr Ala Tyr Arg Leu Ser Thr Gly Leu Met Ile Ala Ser Val Ala
320 325 330

gtg gaa ctg tgt gaa aac gtg aag ctc tac gga ttc tgg cct ttc tct 1117
Val Glu Leu Cys Glu Asn Val Lys Leu Tyr Gly Phe Trp Pro Phe Ser
335 340 345

aag act atc gaa gac acc cca ctc agt cac cac tac tat gat aac atg 1165
Lys Thr Ile Glu Asp Thr Pro Leu Ser His His Tyr Tyr Asp Asn Met
350 355 360

tta cct aag cat ggt ttc cac cag atg cct aaa gaa tac agc caa atg 1213
Leu Pro Lys His Gly Phe His Gln Met Pro Lys Glu Tyr Ser Gln Met
365 370 375

ctc cag ctc cat atg aga gga atc ctc aaa ctg caa ttc agc aaa tgt 1261

Leu Gln Leu His Met Arg Gly Ile Leu Lys Leu Gln Phe Ser Lys Cys

370

385

390

395

gaa acg gct taa cgtttct tagaaggaga ataatttcag gaggtggagt 1310

Glu Thr Ala

398

ggatgtgtca cagcatctcc aaaaagccaa tagaagaagg cacagagaaa gcatgaatta 1370

caaaggcgct ctcccacttg tctagaccaa agccaccgc cccactcac tttgcagcct 1430

ccacgagtca ctcatctca ccttcaacgt tctttctctg agaatagaga ccaaaacatc 1490

agacttgat aagtaaaatg agataatctt tcaatcatc atagaatttg atttgagcca 1550

gggtctctca gaatgcttcc ttgttcctat ccatgatagc cattcccacc tttatcagag 1610

tggtaatgaa actgtgcaat tgtgccaaag accctttctg aagagaatgt ctgaatcatg 1670

cgccgagttt ttacacacag ctcttccttt ataaataaat ccttcccatt ctccctccta 1730

gtagagtaca gaaacaaaat acccttgatg attcaggaag aaaagtcttt tttacttagc 1790

aatgtgcctg cttctgattc agttcgcttg tgacattaag ctgggttggg gttttggttg 1850

gatttggggc gtttcttcac ttcttttgtc tatattttcc ttacctttat cagtttgtat 1910

tcgagcttcc tgctttggga ttctgcaatt ctctctccca ctgacaggat caactcaatg 1970

acataaagta gttcaaacat ccattgcttc tcacatgttt tatccataaa gttactcatc 2030

tgattttatt taaaatagtg aacatctact tgatatcaga cccgaggacc atcctccatt 2090

ggagaatatg aagatattgt cactggcaga aaagcaggtg tgtgccatta attgataaga 2150

taccacaagc atcatcatgc cagttatgaa cacagtgtg aaaggatcat agacaggggt 2210

ggttaaactc gatcccagta gaataaactt cagtgtacct atttcaggga agagttaatt 2270

tcacaattaa aactagtaaa tgaaccaatt cttaggcaca ttaagtggat tctgagtaaa 2330

agaaaggga cagcaggaga aagctgttcg cttggttctg attacccaaa tgagcatgct 2390

ggaaggaggt tgtgaggcta cgctaaaacc tctgcgtagg gagagagtag agtgcagtag 2450

tgtggcggt tttgtccaca ctctgaagg gtgagtaatt cagagccaat cacatcacia 2510

ggatggacac acctaaactc tcacttcagg gggagatgaa tgctttcatg agaaattaca 2570

ctcataagct aagcatcagt tttagagtaaa atttgagtag atgttaaata tgaacatttt 2630
 atacctctta ctaatgtccc accgacacct tttaatgtaa gcacatttat ttattaagtt 2690
 acttgacatt aaatgcttat gtctgtatat tctgttcac catcgatttt cccaaaaagt 2750
 aagagcatag gagatgaggc ctacatgcca agaaaactat aaattttact ctttaattct 2810
 tacttgagcc agcttgttgt ttatcaagtg cttttttgaa gagacagcac cctgtgaatt 2870
 cttcattctg atacagtgtc accttgatt taacatttgt aatgttgttt caagtttaca 2930
 tctctttcat tcttttatag caaatcaaac gtattagctt cagaaattta tcagaagttc 2990
 atatataaat attttgcaaa gggtaaaagg cttttttggt aaataaaata aaatttatta 3050
 ttttcttctg atgaatagag gctcttttat gctgctgcta atgaacctaa ttagctttaa 3110
 attatctcct agcaacattg gtcacgtttc aatcatgcta ttagcaaaaa aaaaaa 3166

<210> 3

<211> 398

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Arg Pro Gly Gly Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Trp Cys Pro Ala Asp Ala Pro Gly Arg

20 25 30

Ala Arg Ile Leu Val Glu Glu Ser Arg Glu Ala Thr His Gly Thr Pro

35 40 45

Ala Ala Leu Arg Thr Leu Arg Ser Pro Ala Thr Ala Val Pro Arg Ala

50 55 60

Thr Asn Ser Thr Tyr Leu Asn Glu Lys Ser Leu Gln Leu Thr Glu Lys

65 70 75 80

Cys Lys Asn Leu Gln Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ser Asn Lys Thr Lys

85 90 95

Gly Tyr Ser Glu Asn Asp Tyr Leu Gln Ile Ile Thr Asp Ile Gln Ser
100 105 110

Cys Pro Trp Lys Arg Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Asn Phe Arg Ala Lys
115 120 125

Leu Ala Ser Cys Cys Asp Ala Val Gln Asn Phe Val Val Ser Gln Asn
130 135 140

Asn Thr Pro Val Gly Thr Asn Met Ser Tyr Glu Val Glu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Glu Ile Pro Ile Lys Lys Asn Ile Phe His Met Phe Pro Val Ser Gln
165 170 175

Pro Phe Val Asp Tyr Pro Tyr Asn Gln Cys Ala Val Val Gly Asn Gly
180 185 190

Gly Ile Leu Asn Lys Ser Leu Cys Gly Thr Glu Ile Asp Lys Ser Asp
195 200 205

Phe Val Phe Arg Cys Asn Leu Pro Pro Thr Thr Gly Asp Val Ser Lys
210 215 220

Asp Val Gly Ser Lys Thr Asn Leu Val Thr Ile Asn Pro Ser Ile Ile
225 230 235 240

Thr Leu Lys Tyr Gly Asn Leu Lys Glu Lys Lys Ala Leu Phe Leu Glu
245 250 255

Asp Ile Ala Thr Tyr Gly Asp Ala Phe Phe Phe Leu Pro Ala Phe Ser
260 265 270

Phe Arg Ala Asn Thr Gly Thr Ser Phe Lys Val Tyr Tyr Thr Leu Glu
275 280 285

Glu Ser Lys Ala Arg Gln Lys Val Leu Phe Phe His Pro Lys Tyr Leu
290 295 300

Lys Asp Leu Ala Leu Phe Trp Arg Thr Lys Gly Val Thr Ala Tyr Arg

305 310 315 320
 Leu Ser Thr Gly Leu Met Ile Thr Ser Val Ala Val Glu Leu Cys Lys
 325 330 335
 Asn Val Lys Leu Tyr Gly Phe Trp Pro Phe Ser Lys Thr Val Glu Asp
 340 345 350
 Ile Pro Val Ser His His Tyr Tyr Asp Asn Lys Leu Pro Lys His Gly
 355 360 365
 Phe His Gln Met Pro Lys Glu Tyr Ser Gln Ile Leu Gln Leu His Met
 370 375 380
 Lys Gly Ile Leu Lys Leu Gln Phe Ser Lys Cys Glu Val Ala
 385 390 395

<210> 4

<211> 1500

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

ggtggcggcg gcggcgggag ccgcgagtcg gggccgcccg ggctgtgctt cgccccggca 60
 gcagcgggtgg cggcggcgcc tgtggctcag g 91
 atg cgg ccg ggg ggc gca ctg ctc gcc ctg ctc gcc agc ctg ctg ctg 139
 Met Arg Pro Gly Gly Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 ctg ctg ctg ctg cgc ctg ctc tgg tgc ccg gca gac gcg ccc ggc cgc 187
 Leu Leu Leu Leu Arg Leu Leu Trp Cys Pro Ala Asp Ala Pro Gly Arg
 20 25 30
 gcc agg att ctg gtg gag gaa agc agg gag gcc acc cac ggc acc ccc 235
 Ala Arg Ile Leu Val Glu Glu Ser Arg Glu Ala Thr His Gly Thr Pro
 35 40 45

gca gcg ctg agg acg ctc cgg agc ccg gcg acc gcg gta ccg cgc gcc 283
Ala Ala Leu Arg Thr Leu Arg Ser Pro Ala Thr Ala Val Pro Arg Ala
50 55 60

act aac agc aca tat ctg aat gag aag tcg ctc caa ctg acg gag aaa 331
Thr Asn Ser Thr Tyr Leu Asn Glu Lys Ser Leu Gln Leu Thr Glu Lys
65 70 75 80

tgc aaa aat ctg caa tat ggc att gag tct ttc tct aac aaa acg aaa 379
Cys Lys Asn Leu Gln Tyr Gly Ile Glu Ser Phe Ser Asn Lys Thr Lys
85 90 95

ggg tat tca gag aac gac tac ctt cag att atc aca gat ata cag agt 427
Gly Tyr Ser Glu Asn Asp Tyr Leu Gln Ile Ile Thr Asp Ile Gln Ser
100 105 110

tgt cca tgg aaa cgg caa gca gaa gaa tat gca aat ttt aga gcc aaa 475
Cys Pro Trp Lys Arg Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Asn Phe Arg Ala Lys
115 120 125

ctt gct tcc tgc tgt gat gct gtt caa aac ttt gtt gtt tct cag aat 523
Leu Ala Ser Cys Cys Asp Ala Val Gln Asn Phe Val Val Ser Gln Asn
130 135 140

aac act cca gtt ggg act aat atg agt tac gag gtg gaa agc aaa aaa 571
Asn Thr Pro Val Gly Thr Asn Met Ser Tyr Glu Val Glu Ser Lys Lys
145 150 155 160

gaa atc cca att aag aag aac att ttt cat atg ttt cca gtg tcc cag 619
Glu Ile Pro Ile Lys Lys Asn Ile Phe His Met Phe Pro Val Ser Gln
165 170 175

cct ttt gtg gac tac cct tat aat cag tgt gca gtg gtc gga aat ggg 667
Pro Phe Val Asp Tyr Pro Tyr Asn Gln Cys Ala Val Val Gly Asn Gly
180 185 190

gga att ctg aat aag tct ctc tgt gga act gaa ata gat aaa tcc gac 715
 Gly Ile Leu Asn Lys Ser Leu Cys Gly Thr Glu Ile Asp Lys Ser Asp
 195 200 205
 ttc gtt ttt agg tgt aac cta ccc cca acc aca gga gat gtt agt aaa 763
 Phe Val Phe Arg Cys Asn Leu Pro Pro Thr Thr Gly Asp Val Ser Lys
 210 215 220
 gat gtt ggc agt aaa aca aat ctt gtg act ata aat cca agc atc ata 811
 Asp Val Gly Ser Lys Thr Asn Leu Val Thr Ile Asn Pro Ser Ile Ile
 225 230 235 240
 act ctg aaa tat ggg aac tta aag gaa aaa aaa gcc cta ttt ttg gag 859
 Thr Leu Lys Tyr Gly Asn Leu Lys Glu Lys Lys Ala Leu Phe Leu Glu
 245 250 255
 gac att gca acc tat gga gat gca ttt ttt ttt ctg cca gca ttt tcc 907
 Asp Ile Ala Thr Tyr Gly Asp Ala Phe Phe Phe Leu Pro Ala Phe Ser
 260 265 270
 ttc agg gcc aac acg ggt acc tct ttc aaa gta tac tac acg ctc gaa 955
 Phe Arg Ala Asn Thr Gly Thr Ser Phe Lys Val Tyr Tyr Thr Leu Glu
 275 280 285
 gag tct aaa gca aga caa aag gtt cta ttt ttc cat ccc aag tac ctg 1003
 Glu Ser Lys Ala Arg Gln Lys Val Leu Phe Phe His Pro Lys Tyr Leu
 290 295 300
 aaa gat ctg gcc ctt ttc tgg aga act aaa ggt gtg act gca tac cgc 1051
 Lys Asp Leu Ala Leu Phe Trp Arg Thr Lys Gly Val Thr Ala Tyr Arg
 305 310 315 320
 ttg tcc acc ggc ttg atg atc aca agt gtt gca gtg gaa ctg tgt aaa 1099
 Leu Ser Thr Gly Leu Met Ile Thr Ser Val Ala Val Glu Leu Cys Lys
 325 330 335

aat gtg aag ctg tat gga ttc tgg ccc ttc tct aaa act gta gaa gac 1147
 Asn Val Lys Leu Tyr Gly Phe Trp Pro Phe Ser Lys Thr Val Glu Asp
 340 345 350
 ata cct gtc agc cat cac tat tat gac aac aag cta cct aaa cat ggt 1195
 Ile Pro Val Ser His His Tyr Tyr Asp Asn Lys Leu Pro Lys His Gly
 355 360 365
 ttc cat cag atg ccc aaa gaa tac agc cag atc ctc caa ctt cac atg 1243
 Phe His Gln Met Pro Lys Glu Tyr Ser Gln Ile Leu Gln Leu His Met
 370 375 380
 aaa gga atc ctc aaa ctg caa ttt agc aaa tgt gaa gtc gcc taa 1288
 Lys Gly Ile Leu Lys Leu Gln Phe Ser Lys Cys Glu Val Ala
 385 390 395
 acaaagtatc ttaaaatggg aataatttta atataatgca gtaggtgatt aacaatgtct 1348
 ccaaacacca aaggaggtgg ctaaagagta ttttgagatg agccccaaaa tttggtttga 1408
 ccaaagcttc cccactcatt ttgcaatgat ggcaagtcac tcaatccttc tcattcttcac 1468
 tttttctcct tataacatgg acaccatatac tg 1500

<210> 5

<211> 529

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Lys Pro His Leu Lys Gln Trp Arg Gln Arg Met Leu Phe Gly Ile

1 5 10 15

Phe Ala Trp Gly Leu Leu Phe Leu Leu Ile Phe Ile Tyr Phe Thr Asp

20 25 30

Ser Asn Pro Ala Glu Pro Val Pro Ser Ser Leu Ser Phe Leu Glu Thr

35 40 45

Arg Arg Leu Leu Pro Val Gln Gly Lys Gln Arg Ala Ile Met Gly Ala

50	55	60	
Ala His Glu Pro Ser Pro Pro Gly Gly Leu Asp Ala Arg Gln Ala Leu			
65	70	75	80
Pro Arg Ala His Pro Ala Gly Ser Phe His Ala Gly Pro Gly Asp Leu			
	85	90	95
Gln Lys Trp Ala Gln Ser Gln Asp Gly Phe Glu His Lys Glu Phe Phe			
100	105	110	
Ser Ser Gln Val Gly Arg Lys Ser Gln Ser Ala Phe Tyr Pro Glu Asp			
115	120	125	
Asp Asp Tyr Phe Phe Ala Ala Gly Gln Pro Gly Trp His Ser His Thr			
130	135	140	
Gln Gly Thr Leu Gly Phe Pro Ser Pro Gly Glu Pro Gly Pro Arg Glu			
145	150	155	160
Gly Ala Phe Pro Ala Ala Gln Val Gln Arg Arg Arg Val Lys Lys Arg			
	165	170	175
His Arg Arg Gln Arg Arg Ser His Val Leu Glu Glu Gly Asp Asp Gly			
180	185	190	
Asp Arg Leu Tyr Ser Ser Met Ser Arg Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Trp			
195	200	205	
Lys Gly Asn Val Ser Ser Lys Met Leu Asn Pro Arg Leu Gln Lys Ala			
210	215	220	
Met Lys Asp Tyr Leu Thr Ala Asn Lys His Gly Val Arg Phe Arg Gly			
225	230	235	240
Lys Arg Glu Ala Gly Leu Ser Arg Ala Gln Leu Leu Cys Gln Leu Arg			
	245	250	255
Ser Arg Ala Arg Val Arg Thr Leu Asp Gly Thr Glu Ala Pro Phe Ser			
260	265	270	

Ala Leu Gly Trp Arg Arg Leu Val Pro Ala Val Pro Leu Ser Gln Leu

275

280

285

His Pro Arg Gly Leu Arg Ser Cys Ala Val Val Met Ser Ala Gly Ala

290

295

300

Ile Leu Asn Ser Ser Leu Gly Glu Glu Ile Asp Ser His Asp Ala Val

305

310

315

320

Leu Arg Phe Asn Ser Ala Pro Thr Arg Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly

325

330

335

Asn Lys Thr Thr Ile Arg Ile Ile Asn Ser Gln Ile Leu Thr Asn Pro

340

345

350

Ser His His Phe Ile Asp Ser Ser Leu Tyr Lys Asp Val Ile Leu Val

355

360

365

Ala Trp Asp Pro Ala Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Asn Leu Trp Tyr Lys

370

375

380

Lys Pro Asp Tyr Asn Leu Phe Thr Pro Tyr Ile Gln His Arg Gln Arg

385

390

395

400

Asn Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Trp Gln

405

410

415

Leu Trp Asp Ile Ile Gln Glu Asn Thr Lys Glu Lys Ile Gln Pro Asn

420

425

430

Pro Pro Ser Ser Gly Phe Ile Gly Ile Leu Ile Met Met Ser Met Cys

435

440

445

Arg Glu Val His Val Tyr Glu Tyr Ile Pro Ser Val Arg Gln Thr Glu

450

455

460

Leu Cys His Tyr His Glu Leu Tyr Tyr Asp Ala Ala Cys Thr Leu Gly

465

470

475

480

Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Leu Leu Val Gln Arg Leu Asn

485 490 495
Met Gly Thr Gln Gly Asp Leu His Arg Lys Gly Lys Val Val Leu Pro
500 505 510
Gly Phe Gln Ala Val His Cys Pro Ala Pro Ser Pro Val Ile Pro His
515 520 525
Ser

<210> 6
<211> 1800
<212> DNA
<213> Human
<400> 6

ggcgccgggactccctcctggccgcccacagcctgtgcgcattcctgcattcctgccgcc 60
gccccgggacccgagccccggaggtgtccaggcgcggtgccaggcggtactgtgcaggt 120
tcattctgccacccatctgcattaagacacaaggtgctgaccgcagagacctgcc 175
atg aaa cca cac ttg aag caa tgg aga caa cga atg ctt ttc gga ata 223
Met Lys Pro His Leu Lys Gln Trp Arg Gln Arg Met Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15
ttc gct tgg ggg ctc ctc ttt ttg ctg att ttc atc tac ttc acc gac 271
Phe Ala Trp Gly Leu Leu Phe Leu Leu Ile Phe Ile Tyr Phe Thr Asp
20 25 30
agc aac ccc gct gag cct gta ccc agc tcc ctc tcc ttc ctg gag acc 319
Ser Asn Pro Ala Glu Pro Val Pro Ser Ser Leu Ser Phe Leu Glu Thr
35 40 45
agg agg ctc ctg ccg gtg cag ggg aag cag cgg gcc atc atg ggc gcc 367
Arg Arg Leu Leu Pro Val Gln Gly Lys Gln Arg Ala Ile Met Gly Ala
50 55 60
gca cat gag ccc tcc ccg cct ggg ggc ctg gac gca cgc cag gcg ctg 415
Ala His Glu Pro Ser Pro Pro Gly Gly Leu Asp Ala Arg Gln Ala Leu

65	70	75	80
ccc cgc gcc cac cca gcc ggt tcc ttt cat gcg ggg cct gga gac ctg			463
Pro Arg Ala His Pro Ala Gly Ser Phe His Ala Gly Pro Gly Asp Leu			
	85	90	95
cag aaa tgg gcc cag tcc caa gat ggg ttt gaa cat aaa gag ttt ttt			511
Gln Lys Trp Ala Gln Ser Gln Asp Gly Phe Glu His Lys Glu Phe Phe			
	100	105	110
tca tcc cag gtg ggg aga aaa tct caa agt gct ttc tac ccg gag gat			559
Ser Ser Gln Val Gly Arg Lys Ser Gln Ser Ala Phe Tyr Pro Glu Asp			
	115	120	125
gac gac tac ttt ttt gct gct ggt cag cca ggg tgg cac agc cac act			607
Asp Asp Tyr Phe Phe Ala Ala Gly Gln Pro Gly Trp His Ser His Thr			
	130	135	140
cag ggg aca ttg gga ttc cct tcc ccc ggg gag cca ggc cca cgg gag			655
Gln Gly Thr Leu Gly Phe Pro Ser Pro Gly Glu Pro Gly Pro Arg Glu			
	145	150	155
ggg gct ttt ccg gct gca cag gtc cag agg agg cgg gtg aag aag agg			703
Gly Ala Phe Pro Ala Ala Gln Val Gln Arg Arg Arg Val Lys Lys Arg			
	165	170	175
cac cgg agg cag aga agg agc cac gtg ttg gag gag ggc gac gac ggc			751
His Arg Arg Gln Arg Arg Ser His Val Leu Glu Glu Gly Asp Asp Gly			
	180	185	190
gac agg ctg tac tcc tcc atg tcc agg gcc ttc ctg tac cgg ctc tgg			799
Asp Arg Leu Tyr Ser Ser Met Ser Arg Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Trp			
	195	200	205
aag ggg aac gtc tct tcc aaa atg ctg aac ccg cgc ctg cag aag gcg			847
Lys Gly Asn Val Ser Ser Lys Met Leu Asn Pro Arg Leu Gln Lys Ala			

210 215 220
atg aag gat tac ctg acc gcc aac aag cac ggg gtg cgc ttc cgc ggg 895
Met Lys Asp Tyr Leu Thr Ala Asn Lys His Gly Val Arg Phe Arg Gly
225 230 235 240
aag cgg gag gcc ggg ctg agc agg gca cag ctg ctg tgc cag ctg cgg 943
Lys Arg Glu Ala Gly Leu Ser Arg Ala Gln Leu Leu Cys Gln Leu Arg
245 250 255
agc cgc gcg cgc gtg cgg acg ctg gac ggc acc gag gcg ccc ttt tct 991
Ser Arg Ala Arg Val Arg Thr Leu Asp Gly Thr Glu Ala Pro Phe Ser
260 265 270
gcg ctg ggc tgg cgg cgc ctg gtg ccc gcc gtg ccc ctg agc cag ctg 1039
Ala Leu Gly Trp Arg Arg Leu Val Pro Ala Val Pro Leu Ser Gln Leu
275 280 285
cac ccc cgc ggc ctg cgc agc tgc gct gtc gtc atg tct gca ggc gca 1087
His Pro Arg Gly Leu Arg Ser Cys Ala Val Val Met Ser Ala Gly Ala
290 295 300
atc ctc aac tct tcc ttg ggc gag gaa ata gat tct cat gat gcg gtt 1135
Ile Leu Asn Ser Ser Leu Gly Glu Glu Ile Asp Ser His Asp Ala Val
305 310 315 320
ttg aga ttt aac tct gct cct aca cgt ggt tat gag aaa gat gtt ggg 1183
Leu Arg Phe Asn Ser Ala Pro Thr Arg Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly
325 330 335
aat aaa acc acc ata cgc atc att aat tcg cag att ctg acc aac ccc 1231
Asn Lys Thr Thr Ile Arg Ile Ile Asn Ser Gln Ile Leu Thr Asn Pro
340 345 350
agc cat cac ttc att gac agt tca ctg tat aaa gac gtc att ttg gtg 1279
Ser His His Phe Ile Asp Ser Ser Leu Tyr Lys Asp Val Ile Leu Val

355 360 365
gcc tgg gac cct gcc cca tat tcc gca aat ctt aac ctg tgg tac aaa 1327
Ala Trp Asp Pro Ala Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Asn Leu Trp Tyr Lys
370 375 380
aaa ccg gat tac aac ctg ttc act cca tat att cag cat cgt cag aga 1375
Lys Pro Asp Tyr Asn Leu Phe Thr Pro Tyr Ile Gln His Arg Gln Arg
385 390 395 400
aac cca aat cag cca ttt tac att ctt cat cct aaa ttt ata tgg cag 1423
Asn Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Trp Gln
405 410 415
ctc tgg gat att atc cag gag aac act aaa gag aag att caa cca aac 1471
Leu Trp Asp Ile Ile Gln Glu Asn Thr Lys Glu Lys Ile Gln Pro Asn
420 425 430
cca cca tct tct ggt ttc att gga atc ctc atc atg atg tcc atg tgc 1519
Pro Pro Ser Ser Gly Phe Ile Gly Ile Leu Ile Met Met Ser Met Cys
435 440 445
aga gag gtg cac gtg tat gaa tat atc cca tcc gtg cgg cag acg gag 1567
Arg Glu Val His Val Tyr Glu Tyr Ile Pro Ser Val Arg Gln Thr Glu
450 455 460
ctg tgc cac tac cac gag ctg tac tac gac gca gcc tgc acc ctc ggg 1615
Leu Cys His Tyr His Glu Leu Tyr Tyr Asp Ala Ala Cys Thr Leu Gly
465 470 475 480
gcg tac cac cca cta ctc tat gag aag ctc ctg gtg cag cgc ctg aac 1663
Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Leu Leu Val Gln Arg Leu Asn
485 490 495
atg ggc acg cag ggg gat ttg cat cgc aag ggc aag gtg gtt ctt cct 1711
Met Gly Thr Gln Gly Asp Leu His Arg Lys Gly Lys Val Val Leu Pro

500 505 510
ggc ttc cag gcg gtg cac tgc cct gca cca agt cca gtc att cca cac 1759
Gly Phe Gln Ala Val His Cys Pro Ala Pro Ser Pro Val Ile Pro His
515 520 525
tct taaaaagggtttcttggaatcaatgtgcaatggtaca 1800
Ser

<210> 7

<211> 524

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 7

Met Lys Pro His Leu Lys Gln Trp Arg Gln Arg Met Leu Phe Gly Ile

1 5 10 15

Phe Val Trp Gly Leu Leu Phe Leu Ala Ile Phe Ile Tyr Phe Thr Asn

20 25 30

Ser Asn Pro Ala Ala Pro Met Pro Ser Ser Phe Ser Phe Leu Glu Ser

35 40 45

Arg Gly Leu Leu Pro Leu Gln Gly Lys Gln Arg Val Ile Met Gly Ala

50 55 60

Leu Gln Glu Pro Ser Leu Pro Arg Ser Leu Asp Ala Ser Lys Val Leu

65 70 75 80

Leu Asp Ser His Pro Glu Asn Pro Phe His Pro Trp Pro Gly Asp Pro

85 90 95

Gln Lys Trp Asp Gln Ala Pro Asn Gly Phe Asp Asn Gly Asp Glu Phe

100 105 110

Phe Thr Ser Gln Val Gly Arg Lys Ser Gln Ser Ala Phe Tyr Pro Glu

115 120 125

Glu Asp Ser Tyr Phe Phe Val Ala Asp Gln Pro Glu Leu Tyr His His

130 135 140
Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Pro Ser Pro Gly Glu Thr Ser Trp Arg
145 150 155 160
Ser Gly Pro Val Gln Pro Lys Gln Lys Leu Leu His Pro Arg Arg Gly
165 170 175
Ser Leu Pro Glu Glu Ala Tyr Asp Ser Asp Met Leu Ser Ala Ser Met
180 185 190
Ser Arg Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Trp Lys Gly Ala Val Ser Ser Lys
195 200 205
Met Leu Asn Pro Arg Leu Gln Lys Ala Met Arg Tyr Tyr Met Ser Phe
210 215 220
Asn Lys His Gly Val Arg Phe Arg Arg Arg Gly Arg Arg Glu Ala Thr
225 230 235 240
Arg Thr Gly Pro Glu Leu Leu Cys Glu Met Arg Arg Arg Val Arg Val
245 250 255
Arg Thr Leu Asp Gly Arg Glu Ala Pro Phe Ser Gly Leu Gly Trp Arg
260 265 270
Pro Leu Val Pro Gly Val Pro Leu Ser Gln Leu His Pro Arg Gly Leu
275 280 285
Ser Ser Cys Ala Val Val Met Ser Ala Gly Ala Ile Leu Asn Ser Ser
290 295 300
Leu Gly Glu Glu Ile Asp Ser His Asp Ala Val Leu Arg Phe Asn Ser
305 310 315 320
Ala Pro Thr Arg Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly Asn Lys Thr Thr Val
325 330 335
Arg Ile Ile Asn Ser Gln Ile Leu Ala Asn Pro Ser His His Phe Ile
340 345 350

Asp Ser Ala Leu Tyr Lys Asp Val Ile Leu Val Ala Trp Asp Pro Ala

355

360

365

Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Asn Leu Trp Tyr Lys Lys Pro Asp Tyr Asn

370

375

380

Leu Phe Thr Pro Tyr Ile Gln His Arg Arg Lys Tyr Pro Thr Gln Pro

385

390

395

400

Phe Tyr Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Trp Gln Leu Trp Asp Ile Ile

405

410

415

Gln Glu Asn Thr Arg Glu Lys Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly

420

425

430

Phe Ile Gly Ile Leu Ile Met Met Ser Met Cys Lys Glu Val His Val

435

440

445

Tyr Glu Tyr Ile Pro Ser Val Arg Gln Thr Glu Leu Cys His Tyr His

450

455

460

Glu Leu Tyr Tyr Asp Ala Ala Cys Thr Leu Gly Ala Tyr His Pro Leu

465

470

475

480

Leu Tyr Glu Lys Leu Leu Val Gln Arg Leu Asn Thr Gly Thr Gln Ala

485

490

495

Asp Leu His His Lys Gly Lys Val Val Leu Pro Gly Phe Gln Thr Leu

500

505

510

Arg Cys Pro Val Thr Ser Pro Asn Asn Thr His Ser

515

520

<210> 8

<211> 1611

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 8

ca atg aaa cca cac ttg aag caa tgg cga caa cga atg ctc ttt gga ata 50
Met Lys Pro His Leu Lys Gln Trp Arg Gln Arg Met Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15
ttt gtt tgg ggg ctc ctc ttt ttg gca att ttc atc tac ttc acc aac 98
Phe Val Trp Gly Leu Leu Phe Leu Ala Ile Phe Ile Tyr Phe Thr Asn
20 25 30
agc aat cct gcg gca cct atg ccc agc tcc ttt tcc ttc ctg gag agc 146
Ser Asn Pro Ala Ala Pro Met Pro Ser Ser Phe Ser Phe Leu Glu Ser
35 40 45
cgt ggg ctc ctg cct cta cag ggc aag cag cgg gtc atc atg ggc gct 194
Arg Gly Leu Leu Pro Leu Gln Gly Lys Gln Arg Val Ile Met Gly Ala
50 55 60
ttg cag gaa ccc tct ttg ccc aga agt ttg gat gca agc aaa gtg ctt 242
Leu Gln Glu Pro Ser Leu Pro Arg Ser Leu Asp Ala Ser Lys Val Leu
65 70 75 80
ctg gac agc cac cct gag aac cct ttc cac cct tgg cct ggg gac cca 290
Leu Asp Ser His Pro Glu Asn Pro Phe His Pro Trp Pro Gly Asp Pro
85 90 95
cag aaa tgg gat cag gcc cca aat ggc ttt gac aat ggg gat gag ttt 338
Gln Lys Trp Asp Gln Ala Pro Asn Gly Phe Asp Asn Gly Asp Glu Phe
100 105 110
ttt aca tcc cag gtt ggg agg aaa tca caa agc gct ttc tat ccc gag 386
Phe Thr Ser Gln Val Gly Arg Lys Ser Gln Ser Ala Phe Tyr Pro Glu
115 120 125
gaa gat agc tat ttt ttt gtt gcg gat cag cct gag ttg tac cac cac 434
Glu Asp Ser Tyr Phe Phe Val Ala Asp Gln Pro Glu Leu Tyr His His
130 135 140

agg cag ggt gca ctg gag ctg cca tct cca ggg gag aca tca tgg cga 482
Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Pro Ser Pro Gly Glu Thr Ser Trp Arg
145 150 155 160
tca gga cct gtt cag ccc aag cag aag ctg ctt cac cca agg cga ggc 530
Ser Gly Pro Val Gln Pro Lys Gln Lys Leu Leu His Pro Arg Arg Gly
165 170 175
agc ttg cct gag gaa gcc tat gac agc gac atg ctg tca gcc tcc atg 578
Ser Leu Pro Glu Glu Ala Tyr Asp Ser Asp Met Leu Ser Ala Ser Met
180 185 190
tcg aga gcc ttc ctg tac cgg ctc tgg aag ggg gcc gtg tcc tct aag 626
Ser Arg Ala Phe Leu Tyr Arg Leu Trp Lys Gly Ala Val Ser Ser Lys
195 200 205
atg ttg aac ccg cgc ctg cag aag gcc atg cgt tac tac atg tcc ttc 674
Met Leu Asn Pro Arg Leu Gln Lys Ala Met Arg Tyr Tyr Met Ser Phe
210 215 220
aac aag cat ggt gtg cgc ttc cgc agg cgg ggt cgg cgt gaa gct aca 722
Asn Lys His Gly Val Arg Phe Arg Arg Arg Gly Arg Arg Glu Ala Thr
225 230 235 240
cgt aca ggg ccg gag ctg ctg tgt gag atg cgc aga cgt gtg cgt gtg 770
Arg Thr Gly Pro Glu Leu Leu Cys Glu Met Arg Arg Arg Val Arg Val
245 250 255
cgc acg ttg gac ggc aga gag gcg ccc ttc tcg ggg ctg ggc tgg cgg 818
Arg Thr Leu Asp Gly Arg Glu Ala Pro Phe Ser Gly Leu Gly Trp Arg
260 265 270
cct ctg gta cca ggt gta cct ctg agc cag ttg cac ccg cgc ggt ctg 866
Pro Leu Val Pro Gly Val Pro Leu Ser Gln Leu His Pro Arg Gly Leu
275 280 285

agc agc tgc gca gtt gtc atg tct gcc ggt gcc atc ctg aac tcc tcc 914
Ser Ser Cys Ala Val Val Met Ser Ala Gly Ala Ile Leu Asn Ser Ser
290 295 300

ttg ggg gag gaa atc gat tct cat gat gca gtt ttg aga ttt aac tct 962
Leu Gly Glu Glu Ile Asp Ser His Asp Ala Val Leu Arg Phe Asn Ser
305 310 315 320

gcc cct acc cgt ggc tac gag aaa gat gtc gga aat aaa acc aca gta 1010
Ala Pro Thr Arg Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly Asn Lys Thr Thr Val
325 330 335

cgc atc att aat tct cag att ctg gcc aac ccc agc cat cac ttc att 1058
Arg Ile Ile Asn Ser Gln Ile Leu Ala Asn Pro Ser His His Phe Ile
340 345 350

gac agt gct tta tat aaa gat gtt atc ctg gta gcc tgg gat cct gct 1106
Asp Ser Ala Leu Tyr Lys Asp Val Ile Leu Val Ala Trp Asp Pro Ala
355 360 365

cct tat tct gcc aat ctt aac ctg tgg tat aag aag cca gat tac aac 1154
Pro Tyr Ser Ala Asn Leu Asn Leu Trp Tyr Lys Lys Pro Asp Tyr Asn
370 375 380

ctt ttc act cca tat atc cag cat cgc cgg aaa tac ccg act cag cca 1202
Leu Phe Thr Pro Tyr Ile Gln His Arg Arg Lys Tyr Pro Thr Gln Pro
385 390 395 400

ttt tac att ctt cac ccc aag ttc ata tgg cag ctt tgg gac att atc 1250
Phe Tyr Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Trp Gln Leu Trp Asp Ile Ile
405 410 415

cag gag aat aca agg gag aag ata cag ccc aac cca cca tct tct ggt 1298
Gln Glu Asn Thr Arg Glu Lys Ile Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly
420 425 430

ttt att gga atc ctc atc atg atg tcc atg tgt aaa gag gtg cac gtg 1346
Phe Ile Gly Ile Leu Ile Met Met Ser Met Cys Lys Glu Val His Val

435

440

445

tat gag tac atc cca tct gtt cga cag aca gag ctt tgc cac tac cat 1394
Tyr Glu Tyr Ile Pro Ser Val Arg Gln Thr Glu Leu Cys His Tyr His

450

455

460

gag ctg tac tac gac gca gcc tgc acc ttg ggg gcc tac cac cca ctg 1442
Glu Leu Tyr Tyr Asp Ala Ala Cys Thr Leu Gly Ala Tyr His Pro Leu

465

470

475

480

ctc tat gaa aag cta ctg gtg cag cgc ctt aac aca ggc acc cag gca 1490
Leu Tyr Glu Lys Leu Leu Val Gln Arg Leu Asn Thr Gly Thr Gln Ala

485

490

495

gac ttg cat cac aag ggc aag gta gtc ttg cca ggc ttc cag acc ctt 1538
Asp Leu His His Lys Gly Lys Val Val Leu Pro Gly Phe Gln Thr Leu

500

505

510

cgg tgt cca gta acc agc ccc aac aat aca cat tct taa 1577
Arg Cys Pro Val Thr Ser Pro Asn Asn Thr His Ser

515

520

aatggaactc ttgggaactg atgtgcaata aggt 1611

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

cttttctgga gaactaaagg

20

<210> 10

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 10
aattgcagtt tgaggattcc 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 11
tggctcagga tgagatcggg 20

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 12
tactagcgct ccctgtgatt gg 22

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 13
tgctctcgag ccagccgac gcgcctgccc 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

tattctcgag ctaagaaacg ttaagccggt 30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

caattgacat atctgaatga gaagtcgctc 30

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

tactaacatc tcctgtgggt gg 22

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

ccagtgtccc agccttttgt 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

tgagtgggga agctttggtc

20

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

gacaatgggg atgagttttt tacatcccag

30

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

cgatttcctc cccaaggag gagttcagg

29

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

acgttgacg gcagagagc gcccttctcg

30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

accttattgc acatcagttc ccaagagttc 30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

caatgaaacc acacttgaag caatggcgac 30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

cgcaacaaaa aaatagctat cttcctcggg 30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

tcattactt cacctcgagc aaccccgctg 30

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 26
catccaattg accaacagca atcctgcggc 30

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 27
ttatgattca caccaacctg aag 23

<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 28
ctttgtactt gttcatgctt agg 23

<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 29
agacgtcatt ttggtggcct ggg 23

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

ttaagagtgt ggaatgactg g

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/00883

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/54, 9/10, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/54, 9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ, PIR/SWISSPROT, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	GENBANK Accession No.AAG66954 CN 1298005 A (SHANGHAI BORONG GENE DEV CO., LTD.), 06 June, 2001 (06.06.01), (Family: none)	1-15 16-30
P,X P,A	TAKASHIMA S. et al., Molecular cloning and expression of a sixth type of alpha 2,8-sialyltransferase (ST8Sia VI) that sialylates O-glycans. J.Biol.Chem., 05 July, 2002 (05.07.02), 227(27), p.24030-8	1-15 16-30
P,X P,A	GENBANK Accession No.AJ512141 Krzewinski-Recchi M.A., Homo sapiens partial mRNA for beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. 09 January, 2003 (09.01.03)	15-30 1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 13 March, 2003 (13.03.03)

Date of mailing of the international search report
 01 April, 2003 (01.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No.

PCT/JP03/00883

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KUROSAWA N. et al., Molecular cloning and expression of chick embryo Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,6-sialyltransferase. Comparison with the mammalian enzyme. Eur.J.Biochem., 15 January, 1994 (15.01.94), 219(1-2), p.375-81	17-30 1-16
A	KONO M. et al., Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha 2,8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate specificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesize GD1c, GT1a, GQ1b and GT3. J.Biol.Chem., 15 November, 1996 (15.11.96), 271(46), p.29366-71	1-30
A	SASAKI K. et al., Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthetase). J.Biol.Chem., 03 June, 1994 (03.06.94), 269(22), p.15950-6	1-30
A	SATO C. et al., Identification and adipocyte differentiation-dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue-specific glycoprotein, adipo Q. J.Biol.Chem., 03 August, 2001 (03.08.01), 276(31), p.28849-56	1-30
A	WEINSTEIN J. et al., Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagines. Enzymatic characterization of a Gal beta 1 to 3(4)GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase and Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase from rat liver. J.Biol.Chem., 25 November, 1982 (25.11.82), 257(22), p.13845-53	1-30
A	WLASICHUK KB et al., Determination of the specificities of rat liver Gal(beta 1-4)GlcNAc alpha 2,6-sialyltransferase and Gal(beta 1-3/4)GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase using synthetic modified acceptors. J.Biol.Chem., 05 July, 1993 (05.07.93), 268(19), p.13971-7	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/00883

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 15 relate to an α 2,8-sialyltransferase having a specific substrate specificity while the inventions as set forth in claims 16 to 30 relate to an α 2,6-sialyltransferase having a specific substrate specificity. Thus, these groups of inventions have a common matter, i.e., a sialyltransferase. However, sialyltransferases had been publicly known (J. Biol. Chem., 1996, 271(46), p. 29366-29371) and therefore these groups of inventions cannot be considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus, there is no special technical matter common to all claims.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/54, 9/10, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/54, 9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

PIR/SWISSPROT

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する・ 請求の範囲の番号
X A	GENBANK Accession No. AAG66954 CN 1298005 A (SHANGHAI BORONG GENE DEV CO LTD) 2001. 06. 06 (ファミリーなし)	1-15 16-30
PX PA	TAKASHIMA S. et al., Molecular cloning and expression of a sixth type of alpha 2,8-sialyltransferase (ST8Sia VI) that sialylates O-glycans. J Biol Chem, 2002 Jul 5, 277 (27), p. 24030-8	1-15 16-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 03. 03

国際調査報告の発送日

01.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PA	GENBANK Accession NO. AJ512141 Krzewinski-Recchi M A, Homo sapiens partial mRNA for beta-galactoside alpha-2, 6-sialyltransferase. 2003. 01. 09	15-30 1-15
X A	KUROSAWA N et al., Molecular cloning and expression of chick embryo Gal beta 1, 4GlcNAc alpha 2, 6-sialyltransferase. Comparison with the mammalian enzyme. Eur J Biochem, 1994 Jan 15, 219(1-2), p. 375-81	17-30 1-16
A	KONO M et al., Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha2, 8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate specificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesize GD1c, GT1a, GQ1b and GT3. J Biol Chem, 1996 Nov 15, 271(46), p. 29366-71	1-30
A	SASAKI K et al., Expression cloning of a GM3-specific alpha-2, 8-sialyltransferase (GD3 synthase). J Biol Chem, 1994 Jun 3, 269(22), p. 15950-6	1-30
A	SATO C et al., Identification and adipocyte differentiation- dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue-specific glycoprotein, adipo Q. J Biol Chem, 2001 Aug 3, 276(31), p. 28849-56	1-30
A	WEINSTEIN J et al., Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. Enzymatic characterization of a Gal beta 1 to 3(4)GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase and a Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase from rat liver. J Biol Chem, 1982 Nov 25, 257(22), p. 13845-53	1-30
A	WLASICHUK KB et al., Determination of the specificities of rat liver Gal(beta 1-4)GlcNAc alpha 2, 6-sialyltransferase and Gal(beta 1-3/4)GlcNAc alpha 2, 3-sialyltransferase using synthetic modified acceptors. J Biol Chem, 1993 Jul 5, 268(19), p. 13971-7	1-30

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-15に係る発明は特定の基質特異性を有する α 2, 8-シアリルトランスフェラーゼに関するもの、請求の範囲16-30に係る発明は特定の基質特異性を有する α 2, 6-シアリルトランスフェラーゼに関するものであり、両者はシアリルトランスフェラーゼである点でのみ共通する。しかし、シアリルトランスフェラーゼは公知（J. Biol. Chem., 1996, 271(46), p. 29366-29371）であるから、両発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲全てに共通の特別な技術的事項はない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.